

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
4 octobre 2001 (04.10.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 01/72822 A2**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :

C07K 14/47

rue Bertré Albrecht, F-92220 Bagneux (FR). **LESAGE, Suzanne** [FR/FR]; 2, allée de la Rocade, F-78700 Conflans-Sainte-Honorine (FR). **CHAMAILLARD, Mathias** [FR/FR]; 3, rue des Ecureuils, F-37300 Joue-les-Tours (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR01/00935

(22) Date de dépôt international : 27 mars 2001 (27.03.2001)

(74) Mandataires : **MARTIN, Jean-Jacques** etc.; Cabinet Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(81) États désignés (*national*) : AU, CA, JP, NZ, US, ZA.

(30) Données relatives à la priorité :

00/03832 27 mars 2000 (27.03.2000) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : **FONDATION JEAN DAUSSET-CEPH** [FR/FR]; 27, rue Juliette Dodu, F-75010 Paris (FR).

Publiée :

— *sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport*

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **HUGOT, Jean-Pierre** [FR/FR]; 5, rue de Thionville, F-75019 Paris (FR). **THOMAS, Gilles** [FR/FR]; 15, rue Buffon, F-75005 Paris (FR). **ZOUALI, Mohamed** [FR/FR]; 4,

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*



**WO 01/72822 A2**

(54) Title: GENES INVOLVED IN INTESTINAL INFLAMMATORY DISEASES AND USE THEREOF

(54) Titre : GENES IMPLIQUES DANS LES MALADIES INFLAMMATOIRES DE L'INTESTIN ET LEUR UTILISATION

(57) Abstract: The invention concerns genes involved in inflammatory and/or immune diseases and some cancers, in particular intestinal cryptogenic inflammatory diseases, and proteins coded by said genes. The invention also concerns methods for diagnosing inflammatory diseases.

(57) Abrégé : La présente invention concerne des gènes impliqués dans les maladies inflammatoires et/ou immunes et certains cancers, en particulier les maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin, ainsi que les protéines codées par ces gènes. Des méthodes de diagnostics de maladies inflammatoires sont également des objets de la présente invention.

## **GENES IMPLIQUES DANS LES MALADIES INFLAMMATOIRES DE L'INTESTIN ET LEUR UTILISATION**

La présente invention concerne des gènes impliqués dans les  
5 maladies inflammatoires et/ou immunes et certains cancers, en particulier les  
maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin, ainsi que les protéines  
codées par ces gènes. Des méthodes de diagnostics de maladies inflammatoires sont  
également des objets de la présente invention.

Les maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin (MICI) sont des  
10 maladies caractérisées par une inflammation du tube digestif dont la cause est  
inconnue. Selon la localisation et les caractéristiques de l'inflammation on distingue  
deux entités nosologiques différentes: la rectocolite hémorragique (RCH) et la  
maladie de Crohn (MC). La RCH a été décrite par S Wilkes en 1865 tandis que le  
premier cas d'iléite régionale a été rapportée par Crohn en 1932. En réalité, il est  
15 possible que ces deux maladies soient beaucoup plus anciennes.

Les MICI sont des maladies chroniques qui évoluent tout au long de la vie et  
qui touchent environ 1 à 2 personnes sur 1000 habitants dans les pays occidentaux,  
ce qui représente entre 60.000 et 100.000 malades en France. Il s'agit de maladies  
apparaissant chez le sujet jeune (le pic d'incidence est dans la troisième décennie),  
20 évoluant par poussées entrecoupées de rémissions, avec des complications  
fréquentes telles que la dénutrition, le retard de croissance chez l'enfant, la  
démminéralisation osseuse et à terme la dégénérescence maligne vers le cancer du  
colon. Il n'existe pas de traitement spécifique. Les thérapeutiques habituelles font  
appel aux anti-inflammatoires, aux immunosuppresseurs et à la chirurgie. Tous ces  
25 moyens thérapeutiques sont eux-mêmes source d'une morbidité iatrogène  
importante. Pour toutes ces raisons les MICI apparaissent comme un important  
problème de santé publique.

L'étiologie des MICI est actuellement inconnue. Des facteurs  
d'environnement sont impliqués dans la survenue de la maladie comme en  
30 témoignent l'augmentation séculaire d'incidence de la maladie et la concordance  
incomplète chez les jumeaux monozygotes. Les seuls facteurs de risque  
environnementaux actuellement reconnus sont 1) le tabac dont le rôle est néfaste

dans la MC et bénéfique dans la RCH et 2) l'appendicectomie qui a un rôle protecteur pour la RCH.

Une prédisposition génétique est depuis longtemps suspectée devant l'existence d'agréations ethniques et familiales de ces maladies. En effet, les MICI  
5 sont plus fréquentes dans la population caucasienne et en particulier la population juive d'Europe centrale. Les formes familiales représentent de 6 à 20% des cas de MICI. Elles sont particulièrement fréquentes lorsque le début de la maladie est précoce. Cependant, ce sont les études chez les jumeaux qui ont permis de confirmer le caractère génétique de ces maladies. En effet, le taux de concordance  
10 entre jumeaux pour ces maladies est plus important chez les jumeaux monozygotes que chez les jumeaux dizygotes plaidant fortement pour une composante héréditaire aux MICI, en particulier à la MC. Selon toute vraisemblance, les MICI sont des maladies génétiques complexes faisant intervenir plusieurs gènes différents, en interaction entre eux et avec des facteurs d'environnement. Les MICI peuvent donc  
15 être classées dans le cadre des maladies multifactorielles.

Deux grandes stratégies ont été développées afin de mettre en évidence les gènes de susceptibilité aux MICI. La première repose sur l'analyse de gènes candidats pour des raisons physiopathologiques. Ainsi de nombreux gènes ont été proposés comme potentiellement importants pour les MICI. Il s'agit souvent de  
20 gènes ayant un rôle dans l'inflammation et la réponse immune. On peut citer les gènes HLA, TAP, TNF, MICA, le récepteur T du lymphocyte, ICAM1, l'interleukine 1, CCR5, etc. D'autres gènes participent à des fonctions diverses tels que GAI2, la motiline, MRAMP, HMLH1, etc. En réalité, aucun des différents gènes candidats étudiés n'a actuellement fait la preuve définitive de son rôle dans la  
25 survenue des MICI.

Le récent développement de cartes du génome humain utilisant des marqueurs génétiques hautement polymorphes a permis aux généticiens de développer une approche non ciblée sur l'ensemble du génome. Cette démarche, appelée aussi génétique inverse ou clonage positionnel, ne fait aucune hypothèse sur  
30 les gènes impliqués dans la maladie et tente de découvrir ceux-ci à travers un criblage systématique du génome. La méthode la plus utilisée pour les maladies génétiques complexes repose sur l'étude de l'identité par la descendance des malades d'une même famille. Cette valeur est calculée pour un grand nombre (300-

400) de marqueurs de polymorphisme répartis régulièrement (tous les 10cM) sur le génome. En cas d'excès d'identité entre malades, le(s) marqueur(s) testé(s) indique(nt) une région supposée contenir un gène de susceptibilité à la maladie. Dans le cas des maladies génétiques complexes, le modèle sous-jacent à la  
5 prédisposition génétique (nombre de gènes et importance respective de chacun d'entre eux) étant inconnu, les méthodes statistiques à utiliser devront être adaptées.

La présente invention concerne la mise en évidence de la séquence nucléique de gènes impliqués dans les MICI, et d'autres maladies inflammatoires, ainsi que l'utilisation de ces séquences nucléiques.

10 Dans le cadre de la présente invention, des travaux préliminaires des inventeurs ont déjà permis de localiser un gène de susceptibilité à la MC. En effet, les inventeurs (Hugot et al., 1996) ont montré qu'un gène de susceptibilité à la MC était localisé dans la région péricentromérique du chromosome 16 (figure 1). Il s'agissait du premier gène de susceptibilité à une maladie génétique complexe  
15 localisé par clonage positionnel et satisfaisant aux critères stricts proposés dans la littérature (Lander et Kruglyak, 1995). Ce gène a été nommé IBD1 (pour Inflammatory Bowel Disease 1). Depuis, d'autres localisations ont été proposées par d'autres auteurs en particulier sur les chromosomes 12, 1, 3, 6 et 7 (Satsangi et al., 1996 ; Cho et al., 1998). Bien que localisés, aucun de ces gènes de susceptibilité  
20 aux MICI n'a actuellement pu être identifié.

Certains auteurs n'ont pu répliquer cette localisation (Rioux et al., 1998). Ceci n'est cependant pas surprenant dans le cas de maladies génétiques complexes où une hétérogénéité génétique est probable.

Il est intéressant de noter que selon la même approche de clonage  
25 positionnel, des localisations ont aussi été proposées sur le chromosome 16 pour plusieurs maladies immunes et inflammatoires telles que la spondylarthrite ankylosante, le syndrome de Blau, le psoriasis, etc. (Becker et al., 1998 ; Tromp et al., 1996). Toutes ces maladies pourraient alors partager un même gène (ou un même groupe de gènes) localisé sur le chromosome 16.

30 Le maximum des tests de liaison génétique est situé pratiquement toujours à la même position, au niveau de D16S409 ou D16S411 séparés seulement de 2cM. Ce résultat est en opposition avec la taille importante (habituellement supérieure à



20cM) de l'intervalle de confiance attribuable à la localisation génétique selon une démarche utilisant des analyses de liaison non paramétriques.

La comparaison des tests statistiques utilisés dans les travaux des inventeurs montre que les tests basés sur l'identité par descendance complète (Tz2) sont  
5 meilleurs que les tests basés sur la moyenne de l'identité par descendance (Tz) (fig. 1). Une telle différence peut être expliquée par un effet récessif de IBD1.

Plusieurs gènes connus dans la région péricentromérique du chromosome 16, tels que le récepteur à l'interleukine 4, CD19, CD43, CD11, apparaissent comme de bons candidats potentiels pour la MC. Des résultats préliminaires ne plaident  
10 cependant pas en faveur de l'implication de ces gènes dans la MC.

En particulier, la présente invention fournit la séquence non seulement du gène IBD1, mais également la séquence partielle d'un autre gène, appelé IBD1prox en raison de sa localisation à proximité d'IBD, et mis en évidence comme rapporté dans les exemples ci-après. Ces gènes dont la séquence d'ADNc correspond  
15 respectivement à SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 4 sont donc potentiellement impliqués dans de nombreuses maladies inflammatoires et/ou immunes ainsi que dans des cancers.

La séquence peptidique exprimée par les gènes IBD1 et IBD1prox est représentée par SEQ ID N° 2 et SEQ ID N° 5 respectivement; la séquence  
20 génomique de ces gènes est représentée par SEQ ID N° 3 et SEQ ID N° 6 respectivement.

Ainsi, la présente invention a pour objet un acide nucléique purifié ou isolé, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléique choisie dans le groupe de séquences suivantes :

- 25                   a) SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4 et SEQ ID N° 6 ;  
                  b) la séquence d'un fragment d'au moins 15 nucléotides consécutifs d'une séquence choisie parmi SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4 ou SEQ ID N° 6 ;  
                  c) une séquence nucléique présentant un pourcentage d'identité  
30                   d'au moins 80 %, après alignement optimal avec une séquence définie en a) ou b) ;  
                  d) une séquence nucléique s'hybridant dans des conditions de forte stringence avec une séquence nucléique définie en a) ou b) ;

e) la séquence complémentaire ou la séquence de l'ARN correspondant à une séquence telle que définie en a), b), c) ou d).

La séquence d'acides nucléiques selon l'invention définie en c) présente un pourcentage d'identité d'au moins 80 % après alignement optimal avec une  
5 séquence telle que définie en a) ou b) ci-dessus, de préférence 90 %, de façon la plus préférée 98 %.

Par acide nucléique, séquence nucléique ou d'acide nucléique, polynucléotide, oligonucléotide, séquence de polynucléotide, séquence  
nucléotidique, termes qui seront employés indifféremment dans la présente  
10 description, on entend désigner un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique, comportant ou non des nucléotides non naturels, et pouvant correspondre aussi bien à un ADN double brin, un ADN simple brin que des produits de transcription desdits ADNs. Ainsi, les séquences nucléiques selon l'invention englobent  
15 également les PNA (Peptid Nucleic Acid), ou analogues.

Il doit être compris que la présente invention ne concerne pas les séquences nucléotidiques dans leur environnement chromosomique naturel, c'est-à-dire à l'état naturel. Il s'agit de séquences qui ont été isolées et/ou purifiées, c'est-à-dire qu'elles ont été prélevées directement ou indirectement, par exemple par copie, leur  
20 environnement ayant été au moins partiellement modifié. On entend ainsi également désigner les acides nucléiques obtenus par synthèse chimique.

Par « pourcentage d'identité » entre deux séquences d'acides nucléiques ou d'acides aminés au sens de la présente invention, on entend désigner un pourcentage de nucléotides ou de résidus d'acides aminés identiques entre les deux  
25 séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement, ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences étant réparties au hasard et sur toute leur longueur. On entend désigner par "meilleur alignement" ou "alignement optimal", l'alignement pour lequel le pourcentage d'identité déterminé comme ci-après est le plus élevé. Les comparaisons de séquences entre deux  
30 séquences d'acides nucléiques ou d'acides aminés sont traditionnellement réalisées en comparant ces séquences après les avoir alignées de manière optimale, ladite comparaison étant réalisée par segment ou par « fenêtre de comparaison » pour identifier et comparer les régions locales de similarité de séquence. L'alignement

optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé, outre manuellement, au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Smith et Waterman (1981), au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Neddleman et Wunsch (1970), au moyen de la méthode de recherche de similarité de Pearson et Lipman (1988), au  
5 moyen de logiciels informatiques utilisant ces algorithmes (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA et TFASTA dans le Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI). Afin d'obtenir l'alignement optimal, on utilise de préférence le programme BLAST, avec la matrice BLOSUM 62. On peut également utiliser les matrices PAM ou PAM250.

10 Le pourcentage d'identité entre deux séquences d'acides nucléiques ou d'acides aminés est déterminé en comparant ces deux séquences alignées de manière optimale, la séquence d'acides nucléiques ou d'acides aminés à comparer pouvant comprendre des additions ou des délétions par rapport à la séquence de référence pour un alignement optimal entre ces deux séquences. Le pourcentage  
15 d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide ou le résidu d'acide aminé est identique entre les deux séquences, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions comparées et en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le pourcentage d'identité entre ces deux séquences.

20 Par séquences nucléiques présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 %, après alignement optimal avec une séquence de référence, on entend désigner les séquences nucléiques présentant, par rapport à la séquence nucléique de référence, certaines modifications comme en particulier une délétion, une troncation, un allongement,  
25 une fusion chimérique, et/ou une substitution, notamment ponctuelle, et dont la séquence nucléique présente au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 %, d'identité après alignement optimal avec la séquence nucléique de référence. Il s'agit de préférence de séquences dont les séquences complémentaires sont susceptibles de s'hybrider spécifiquement avec les séquences SEQ ID N° 1 ou  
30 SEQ ID N° 4 de l'invention. De préférence, les conditions d'hybridation spécifiques ou de forte stringence seront telles qu'elles assurent au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 % d'identité après alignement optimal entre l'une des deux séquences et la séquence complémentaire de l'autre.

Une hybridation dans des conditions de forte stringence signifie que les conditions de température et de force ionique sont choisies de telle manière qu'elles permettent le maintien de l'hybridation entre deux fragments d'ADN complémentaires. A titre illustratif, des conditions de forte stringence de l'étape  
5 d'hybridation aux fins de définir les fragments polynucléotidiques décrits ci-dessus, sont avantageusement les suivantes.

L'hybridation ADN-ADN ou ADN-ARN est réalisée en deux étapes : (1) préhybridation à 42°C pendant 3 heures en tampon phosphate (20 mM, pH 7,5) contenant 5 x SSC (1 x SSC correspond à une solution 0,15 M NaCl + 0,015 M  
10 citrate de sodium), 50 % de formamide, 7 % de sodium dodécyl sulfate (SDS), 10 x Denhardt's, 5 % de dextran sulfate et 1 % d'ADN de sperme de saumon ; (2) hybridation proprement dite pendant 20 heures à une température dépendant de la taille de la sonde (i.e. : 42°C, pour une sonde de taille > 100 nucléotides) suivie de 2 lavages de 20 minutes à 20°C en 2 x SSC + 2 % SDS, 1 lavage de 20 minutes à  
15 20°C en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS. Le dernier lavage est pratiqué en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS pendant 30 minutes à 60°C pour une sonde de taille > 100 nucléotides. Les conditions d'hybridation de forte stringence décrites ci-dessus pour un polynucléotide de taille définie, peuvent être adaptées par l'homme du métier pour des oligonucléotides de taille plus grande ou plus petite, selon l'enseignement de  
20 Sambrook et al., 1989.

Parmi les séquences nucléiques présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 %, après alignement optimal avec la séquence selon l'invention, on préfère également les séquences nucléiques variantes de SEQ ID N° 1, ou de SEQ ID N° 4, ou de leurs fragments,  
25 c'est-à-dire l'ensemble des séquences nucléiques correspondant à des variants alléliques, c'est-à-dire des variations individuelles des séquences SEQ ID N° 1 ou SEQ ID N° 4. Ces séquences mutées naturelles correspondent à des polymorphismes présents chez les mammifères, en particulier chez l'être humain et, notamment, à des polymorphismes pouvant conduire à la survenue d'une  
30 pathologie. De préférence, la présente invention concerne les séquences nucléiques variantes dans lesquelles les mutations conduisent à une modification de la séquence d'acides aminés du polypeptide, ou de ses fragments, codés par la séquence normale de SEQ ID N° 1 ou SEQ ID N° 4.

On entend également désigner par séquence nucléique variante tout ARN ou ADNc résultant d'une mutation et/ou variation d'un site d'épissage de la séquence nucléique génomique dont l'ADNc a pour séquence SEQ ID N° 1 ou SEQ ID N° 4.

5 L'invention concerne de préférence un acide nucléique purifié ou isolé selon la présente invention, caractérisé en ce qu'il comprend ou est constitué de l'une des séquences SEQ ID N° 1 ou SEQ ID N° 4, de leurs séquences complémentaires ou des séquences de l'ARN correspondant à SEQ ID N° 1 ou SEQ ID N° 4.

Les amorces ou sondes, caractérisées en ce qu'elles comprennent une séquence d'un acide nucléique selon l'invention, font également partie de  
10 l'invention.

Ainsi, la présente invention concerne également les amorces ou les sondes selon l'invention qui peuvent permettre en particulier de mettre en évidence ou de discriminer les séquences nucléiques variantes, ou d'identifier la séquence génomique des gènes dont l'ADNc est représenté par SEQ ID N° 1 ou SEQ ID N°  
15 4, en utilisant notamment une méthode d'amplification telle que la méthode PCR, ou une méthode apparentée.

L'invention concerne également l'utilisation d'une séquence d'acide nucléique selon l'invention comme sonde ou amorce, pour la détection, l'identification, le dosage ou l'amplification de séquence d'acide nucléique.

20 Selon l'invention, les polynucléotides pouvant être utilisés comme sonde ou comme amorce dans des procédés de détection, d'identification, de dosage ou d'amplification de séquence nucléique, présentent une taille minimale de 15 bases, de préférence de 20 bases, ou mieux de 25 à 30 bases.

Les sondes et amorces selon l'invention peuvent être marquées directement  
25 ou indirectement par un composé radioactif ou non radioactif par des méthodes bien connues de l'homme du métier, afin d'obtenir un signal détectable et/ou quantifiable.

Les séquences de polynucléotides selon l'invention non marquées peuvent être utilisées directement comme sonde ou amorce.

30 Les séquences sont généralement marquées pour obtenir des séquences utilisables pour de nombreuses applications. Le marquage des amorces ou des sondes selon l'invention est réalisé par des éléments radioactifs ou par des molécules non radioactives.

Parmi les isotopes radioactifs utilisés, on peut citer le  $^{32}\text{P}$ , le  $^{33}\text{P}$ , le  $^{35}\text{S}$ , le  $^3\text{H}$  ou le  $^{125}\text{I}$ . Les entités non radioactives sont sélectionnées parmi les ligands tels la biotine, l'avidine, la streptavidine, la dioxygénine, les haptènes, les colorants, les agents luminescents tels que les agents radioluminescents, chémoluminescents, bioluminescents, fluorescents, phosphorescents.

Les polynucléotides selon l'invention peuvent ainsi être utilisés comme amorce et/ou sonde dans des procédés mettant en oeuvre notamment la technique de PCR (amplification en chaîne par polymérase) (Rolfs et al., 1991). Cette technique nécessite le choix de paires d'amorces oligonucléotidiques encadrant le fragment qui doit être amplifié. On peut, par exemple, se référer à la technique décrite dans le brevet américain U.S. N° 4,683,202. Les fragments amplifiés peuvent être identifiés, par exemple après une électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide, ou après une technique chromatographique comme la filtration sur gel ou la chromatographie échangeuse d'ions, puis séquencés. La spécificité de l'amplification peut être contrôlée en utilisant comme amorces les séquences nucléotidiques de polynucléotides de l'invention et comme matrices, des plasmides contenant ces séquences ou encore les produits d'amplification dérivés. Les fragments nucléotidiques amplifiés peuvent être utilisés comme réactifs dans des réactions d'hybridation afin de mettre en évidence la présence, dans un échantillon biologique, d'un acide nucléique cible de séquence complémentaire à celle desdits fragments nucléotidiques amplifiés.

L'invention vise également les acides nucléiques susceptibles d'être obtenus par amplification à l'aide d'amorces selon l'invention.

D'autres techniques d'amplification de l'acide nucléique cible peuvent être avantageusement employées comme alternative à la PCR (PCR-like) à l'aide de couple d'amorces de séquences nucléotidiques selon l'invention. Par PCR-like on entend désigner toutes les méthodes mettant en oeuvre des reproductions directes ou indirectes des séquences d'acides nucléiques, ou bien dans lesquelles les systèmes de marquage ont été amplifiés, ces techniques sont bien entendu connues. En général il s'agit de l'amplification de l'ADN par une polymérase ; lorsque l'échantillon d'origine est un ARN il convient préalablement d'effectuer une transcription reverse. Il existe actuellement de très nombreux procédés permettant cette amplification, comme par exemple la technique SDA (Strand Displacement

Amplification) ou technique d'amplification à déplacement de brin (Walker et al., 1992), la technique TAS (Transcription-based Amplification System) décrite par Kwoh et al. (1989), la technique 3SR (Self-Sustained Sequence Replication) décrite par Guatelli et al. (1990), la technique NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) décrite par Kievitis et al. (1991), la technique TMA (Transcription Mediated Amplification), la technique LCR (Ligase Chain Reaction) décrite par Landegren et al. (1988), la technique de RCR (Repair Chain Reaction) décrite par Segev (1992), la technique CPR (Cycling Probe Reaction) décrite par Duck et al. (1990), la technique d'amplification à la Q-béta-réplacase décrite par Miele et al. (1983). Certaines de ces techniques ont depuis été perfectionnées.

Dans le cas où le polynucléotide cible à détecter est un ARNm, on utilise avantageusement, préalablement à la mise en oeuvre d'une réaction d'amplification à l'aide des amorces selon l'invention ou à la mise en oeuvre d'un procédé de détection à l'aide des sondes de l'invention, une enzyme de type transcriptase inverse afin d'obtenir un ADNc à partir de l'ARNm contenu dans l'échantillon biologique. L'ADNc obtenu servira alors de cible pour les amorces ou les sondes mises en oeuvre dans le procédé d'amplification ou de détection selon l'invention.

La technique d'hybridation de sondes peut être réalisée de manières diverses (Matthews et al., 1988). La méthode la plus générale consiste à immobiliser l'acide nucléique extrait des cellules de différents tissus ou de cellules en culture sur un support (tels que la nitrocellulose, le nylon, le polystyrène) et à incubé, dans des conditions bien définies, l'acide nucléique cible immobilisé avec la sonde. Après l'hybridation, l'excès de sonde est éliminé et les molécules hybrides formées sont détectées par la méthode appropriée (mesure de la radioactivité, de la fluorescence ou de l'activité enzymatique liée à la sonde).

Selon un autre mode de mise en oeuvre des sondes nucléiques selon l'invention, ces dernières peuvent être utilisées comme sondes de capture. Dans ce cas, une sonde, dite « sonde de capture », est immobilisée sur un support et sert à capturer par hybridation spécifique l'acide nucléique cible obtenu à partir de l'échantillon biologique à tester et l'acide nucléique cible est ensuite détecté grâce à une seconde sonde, dite « sonde de détection », marquée par un élément facilement détectable.

Parmi les fragments d'acides nucléiques intéressants, il faut ainsi citer en particulier les oligonucléotides anti-sens, c'est-à-dire dont la structure assure, par hybridation avec la séquence cible, une inhibition de l'expression du produit correspondant. Il faut également citer les oligonucléotides sens qui, par interaction  
5 avec des protéines impliquées dans la régulation de l'expression du produit correspondant, induiront soit une inhibition, soit une activation de cette expression.

Dans les deux cas (sens et anti-sens), les oligonucléotides de l'invention peuvent être utilisés *in vitro* et *in vivo*.

La présente invention concerne également un polypeptide isolé caractérisé  
10 en ce qu'il comprend un polypeptide choisi parmi :

- a) un polypeptide de séquence SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N° 5 ;
- b) un polypeptide variant d'un polypeptide de séquence définie en a) ;
- c) un polypeptide homologue à un polypeptide défini en a) ou b),  
15 comportant au moins 80 % d'identité avec ledit polypeptide de a) ;
- d) un fragment d'au moins 15 acides aminés consécutifs d'un polypeptide défini en a) , b) ou c) ;
- e) un fragment biologiquement actif d'un polypeptide défini en a),  
20 b) ou c).

Par « polypeptide », on entend, au sens de la présente invention, désigner des protéines ou des peptides.

Par « fragment biologiquement actif », on entend un fragment possédant la même activité biologique que le fragment peptidique dont il est déduit, de  
25 préférence dans le même ordre de grandeur (à un facteur 10 près). Ainsi, les exemples montrent que la protéine IBD1 (SEQ ID N° 2) a un rôle potentiel dans les phénomènes d'apoptose. Un fragment biologiquement actif de la protéine IBD1 consiste donc en un polypeptide issu de SEQ ID N° 2 possédant également un rôle dans l'apoptose. Les exemples ci-après proposent des fonctions biologiques pour les  
30 protéines IBD1 et IBD1prox, en fonction des domaines peptidiques de ces protéines et permettent ainsi à l'homme du métier d'identifier les fragments biologiquement actifs.



De préférence un polypeptide selon l'invention est un polypeptide constitué de la séquence SEQ ID N° 2 (correspondant à la protéine codée par le gène IBD1) ou de la séquence SEQ ID N° 5 (correspondant à la protéine codée par IBD1prox) ou d'une séquence possédant au moins 80 % d'identité avec SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N° 5 après alignement optimal.

La séquence du polypeptide présente un pourcentage d'identité d'au moins 80 % après alignement optimal avec les séquences SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N° 5, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 %.

Par polypeptide dont la séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 %, après alignement optimal avec une séquence de référence, on entend désigner les polypeptides présentant certaines modifications par rapport au polypeptide de référence, comme en particulier une ou plusieurs délétions, troncations, un allongement, une fusion chimérique, et/ou une ou plusieurs substitutions.

Parmi les polypeptides dont la séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 %, après alignement optimal avec les séquences SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 5 ou avec l'un de leurs fragments selon l'invention, on préfère les polypeptides variants codés par les séquences nucléiques variantes telles que précédemment définies, en particulier les polypeptides dont la séquence d'acides aminés présente au moins une mutation correspondant notamment à une troncation, délétion, substitution et/ou addition d'au moins un résidu d'acide aminé par rapport aux séquences SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 5 ou avec l'un de leurs fragments, de manière plus préférée les polypeptides variants présentant une mutation liée à une pathologie.

La présente invention concerne également les vecteurs de clonage et/ou d'expression comprenant un acide nucléique ou codant pour un polypeptide selon l'invention. Un tel vecteur peut également contenir les éléments nécessaires à l'expression et éventuellement à la sécrétion du polypeptide dans une cellule hôte. Une telle cellule hôte est également un objet de l'invention.

Les vecteurs caractérisés en ce qu'ils comportent une séquence de promoteur et/ou de régulateur selon l'invention, font également partie de l'invention.

Lesdits vecteurs comportent de préférence un promoteur, des signaux d'initiation et de terminaison de la traduction, ainsi que des régions appropriées de régulation de la transcription. Ils doivent pouvoir être maintenus de façon stable dans la cellule et peuvent éventuellement posséder des signaux particuliers  
5 spécifiant la sécrétion de la protéine traduite.

Ces différents signaux de contrôle sont choisis en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences d'acide nucléique selon l'invention peuvent être insérées dans des vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi.

10 Parmi les systèmes à réplication autonome, on utilise de préférence en fonction de la cellule hôte, des systèmes de type plasmidique ou viral, les vecteurs viraux pouvant notamment être des adénovirus (Perricaudet et al., 1992), des rétrovirus, des lentivirus, des poxvirus ou des virus herpétiques (Epstein et al., 1992). L'homme du métier connaît les technologies utilisables pour chacun de ces  
15 systèmes.

Lorsque l'on souhaite l'intégration de la séquence dans les chromosomes de la cellule hôte, on peut utiliser par exemple des systèmes de type plasmidique ou viral ; de tels virus sont, par exemple, les rétrovirus (Temin, 1986), ou les AAV (Carter, 1993).

20 Parmi les vecteurs non viraux, on préfère les polynucléotides nus tels que l'ADN nu ou l'ARN nu selon la technique développée par la société VICAL, les chromosomes artificiels de bactérie (BAC, bacterial artificial chromosome), les chromosomes artificiels de levure (YAC, yeast artificial chromosome) pour l'expression dans la levure, les chromosomes artificiels de souris (MAC, mouse  
25 artificial chromosome) pour l'expression dans les cellules murines et de manière préférée les chromosomes artificiels d'homme (HAC, human artificial chromosome) pour l'expression dans les cellules humaines.

De tels vecteurs sont préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant peuvent être introduits dans un hôte  
30 approprié par des méthodes standard, telles que par exemple la lipofection, l'électroporation, le choc thermique, la transformation après perméabilisation chimique de la membrane, la fusion cellulaire.

L'invention comprend en outre les cellules hôtes, notamment les cellules eucaryotes et procaryotes, transformées par les vecteurs selon l'invention ainsi que les animaux transgéniques, de préférence les mammifères, excepté l'Homme, comprenant une desdites cellules transformées selon l'invention. Ces animaux  
5 peuvent être utilisés en temps que modèles, pour l'étude de l'étiologie de maladies inflammatoires et/ou immunes, et en particulier des maladies inflammatoires du tube digestif, ou pour l'étude de cancers.

Parmi les cellules utilisables aux sens de la présente invention, on peut citer les cellules bactériennes (Olins et Lee, 1993), mais aussi les cellules de levure  
10 (Buckholz, 1993), de même que les cellules animales, en particulier les cultures de cellules de mammifères (Edwards et Aruffo, 1993), et notamment les cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO). On peut citer également les cellules d'insectes dans lesquelles on peut utiliser des procédés mettant par exemple en œuvre des baculovirus (Luckow, 1993). Un hôte cellulaire préféré pour l'expression des  
15 protéines de l'invention est constitué par les cellules COS.

Parmi les mammifères selon l'invention, on préfère des animaux tels que les rongeurs, en particulier les souris, les rats ou les lapins, exprimant un polypeptide selon l'invention.

Parmi les mammifères selon l'invention, on préfère également des animaux  
20 tels que les souris, les rats ou les lapins, caractérisés en ce que le gène codant pour la protéine de séquence SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N° 5, ou dont la séquence est codée par le gène homologue chez ces animaux, n'est pas fonctionnel, est invalidé ou présente au moins une mutation.

Ces animaux transgéniques sont obtenus par exemple par recombinaison  
25 *homologue sur cellules souches embryonnaires*, transfert de ces cellules souches à des embryons, sélection des chimères affectées au niveau des lignées reproductrices, et croissance desdites chimères.

Les animaux transgéniques selon l'invention peuvent ainsi surexprimer le gène codant pour la protéine selon l'invention, ou leur gène homologue, ou  
30 exprimer ledit gène dans lequel est introduite une mutation. Ces animaux transgéniques, en particulier des souris, sont obtenus par exemple par transfection de copie de ce gène sous contrôle d'un promoteur fort de nature ubiquitaire, ou sélectif d'un type de tissu, ou après transcription virale.

Alternativement, les animaux transgéniques selon l'invention peuvent être rendus déficients pour le gène codant pour l'un des polypeptides de séquences SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N° 5, ou leurs gènes homologues, par inactivation à l'aide du système LOXP/CRE recombinaise (Rohlmann et al., 1996) ou de tout autre système d'inactivation de l'expression de ce gène.

Les cellules et mammifères selon l'invention sont utilisables dans une méthode de production d'un polypeptide selon l'invention, comme décrit ci-dessous, et peuvent également servir à titre de modèle d'analyse.

Les cellules ou mammifères transformés tels que décrits précédemment peuvent aussi être utilisés à titre de modèles afin d'étudier les interactions entre les polypeptides selon l'invention, et les composés chimiques ou protéiques, impliqués directement ou indirectement dans les activités des polypeptides selon l'invention, ceci afin d'étudier les différents mécanismes et interactions mis en jeu.

Ils peuvent en particulier être utilisés pour la sélection de produits interagissant avec les polypeptides selon l'invention, notamment la protéine de séquence SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N° 5 ou leurs variants selon l'invention, à titre de cofacteur, ou d'inhibiteur, notamment compétitif, ou encore ayant une activité agoniste ou antagoniste de l'activité des polypeptides selon l'invention. De préférence, on utilise lesdites cellules transformées ou animaux transgéniques à titre de modèle notamment pour la sélection de produits permettant de lutter contre les pathologies liées à une expression anormale de ce gène.

L'invention concerne également l'utilisation d'une cellule, d'un mammifère ou d'un polypeptide selon l'invention pour le criblage de composés chimiques ou biochimiques pouvant interagir directement ou indirectement avec les polypeptides selon l'invention, et/ou capable de moduler l'expression ou l'activité de ces polypeptides.

De la même façon, l'invention concerne aussi un procédé de criblage de composés capables d'interagir *in vitro* ou *in vivo* avec un acide nucléique selon l'invention, en utilisant un acide nucléique une cellule ou un mammifère selon l'invention, et en détectant la formation d'un complexe entre les composés candidats et l'acide nucléique selon l'invention.

Les composés ainsi sélectionnés sont également objets de l'invention.

L'invention concerne aussi l'utilisation d'une séquence d'acide nucléique selon l'invention pour la synthèse de polypeptides recombinants.

La méthode de production d'un polypeptide de l'invention sous forme recombinante, elle-même comprise dans la présente invention, se caractérise en ce  
5 que l'on cultive les cellules transformées, notamment les cellules ou mammifères de la présente invention, dans des conditions permettant l'expression d'un polypeptide recombinant codé par une séquence d'acide nucléique selon l'invention, et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant.

Les polypeptides recombinants, caractérisés en ce qu'ils sont susceptibles  
10 d'être obtenus par ladite méthode de production, font également partie de l'invention.

Les polypeptides recombinants obtenus comme indiqué ci-dessus, peuvent aussi bien se présenter sous forme glycosylée que non glycosylée et peuvent présenter ou non la structure tertiaire naturelle.

15 Les séquences des polypeptides recombinants peuvent être également modifiées afin d'améliorer leur solubilité, en particulier dans les solvants aqueux.

De telles modifications sont connues de l'homme du métier comme par exemple la délétion de domaines hydrophobes ou la substitution d'acides aminés hydrophobes par des acides aminés hydrophiles.

20 Ces polypeptides peuvent être produits à partir des séquences d'acide nucléique définies ci-dessus, selon les techniques de production de polypeptides recombinants connues de l'homme du métier. Dans ce cas, la séquence d'acide nucléique utilisée est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans un hôte cellulaire.

25 Un système efficace de production d'un polypeptide recombinant nécessite de disposer d'un vecteur et d'une cellule hôte selon l'invention.

Ces cellules peuvent être obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel que défini ci-dessus, puis la mise en culture desdites cellules dans des conditions permettant la réplique  
30 et/ou l'expression de la séquence nucléotidique transfectée.

Les procédés utilisés pour la purification d'un polypeptide recombinant sont connus de l'homme du métier. Le polypeptide recombinant peut être purifié à partir de lysats et extraits cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des

méthodes utilisées individuellement ou en combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de chromatographie, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques, etc...

Les polypeptides selon la présente invention peuvent aussi être obtenus par  
5 synthèse chimique en utilisant l'une des nombreuses synthèses peptidiques connues, par exemple les techniques mettant en œuvre des phases solides (voir notamment Stewart et al., 1984) ou des techniques utilisant des phases solides partielles, par condensation de fragments ou par une synthèse en solution classique.

Les polypeptides obtenus par synthèse chimique et pouvant comporter des  
10 acides aminés non naturels correspondants sont également compris dans l'invention.

Les anticorps mono- ou polyclonaux ou leurs fragments, anticorps chimériques ou immunoconjugués, caractérisés en ce qu'ils sont capables de reconnaître spécifiquement un polypeptide selon l'invention, font partie de l'invention.

15 Des anticorps polyclonaux spécifiques peuvent être obtenus à partir d'un sérum d'un animal immunisé contre les polypeptides selon l'invention, notamment produit par recombinaison génétique ou par synthèse peptidique, selon les modes opératoires usuels.

On note notamment l'intérêt d'anticorps reconnaissant de façon spécifique  
20 certains polypeptides, variants, ou leurs fragments immunogènes, selon l'invention.

Les anticorps mono- ou polyclonaux ou leurs fragments, anticorps chimériques ou immunoconjugués, caractérisés en ce qu'ils sont capables de reconnaître spécifiquement les polypeptides de séquence SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N° 5 sont particulièrement préférés.

25 Les anticorps monoclonaux spécifiques peuvent être obtenus selon la méthode classique de culture d'hybridomes décrite par Köhler et Milstein (1975).

Les anticorps selon l'invention sont, par exemple, des anticorps chimériques, des anticorps humanisés, des fragments Fab ou F(ab')<sub>2</sub>. Ils peuvent également se présenter sous forme d'immunoconjugués ou d'anticorps marqués afin  
30 d'obtenir un signal détectable et/ou quantifiable.

L'invention concerne également des méthodes pour la détection et/ou la purification d'un polypeptide selon l'invention, caractérisées en ce qu'elles mettent en œuvre un anticorps selon l'invention.

L'invention comprend en outre des polypeptides purifiés, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par une méthode selon l'invention.

Par ailleurs, outre leur utilisation pour la purification des polypeptides, les anticorps de l'invention, en particulier les anticorps monoclonaux, peuvent également être utilisés pour la détection de ces polypeptides dans un échantillon biologique.

Ils constituent ainsi un moyen d'analyse immunocytochimique ou immunohistochimique de l'expression des polypeptides selon l'invention, notamment les polypeptides de séquence SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 5 ou l'un de leurs variants, sur des coupes de tissus spécifiques, par exemple par immunofluorescence, marquage à l'or, immuno-conjugués enzymatiques.

Ils peuvent permettre notamment de mettre en évidence une expression anormale de ces polypeptides dans les tissus ou prélèvements biologiques.

Plus généralement, les anticorps de l'invention peuvent être avantageusement mis en œuvre dans toute situation où l'expression d'un polypeptide selon l'invention, normal ou muté, doit être observée.

Ainsi, un procédé de détection d'un polypeptide selon l'invention dans un échantillon biologique, comprenant les étapes de mise en contact de l'échantillon biologique avec un anticorps selon l'invention et de mise en évidence du complexe antigène-anticorps formé est également un objet de l'invention, ainsi qu'une trousse permettant de mettre en œuvre un tel procédé. Une telle trousse contient en particulier :

- a) un anticorps monoclonal ou polyclonal selon l'invention ;
- b) éventuellement des réactifs pour la constitution d'un milieu propice à la réaction immunologique ;
- c) les réactifs permettant la détection du complexe antigène-anticorps produit lors de la réaction immunologique.

Les anticorps selon l'invention peuvent également être utilisés dans le traitement d'une maladie inflammatoire et/ou immune, ou d'un cancer, chez l'homme, lorsque l'on observe une expression anormale du gène IBD1 ou du gène IBD1prox. Une expression anormale signifie une surexpression ou l'expression d'une protéine mutée.

Ces anticorps peuvent être obtenus directement à partir de sérum humain, ou à partir d'animaux immunisés avec des polypeptides selon l'invention, puis « humanisés », et peuvent être utilisés tels quels ou dans la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies précitées.

5 Font également partie de l'invention, les méthodes de détermination d'une variabilité allélique, d'une mutation, d'une délétion, d'une perte d'hétérozygotie ou de toute anomalie génétique du gène selon l'invention, caractérisées en ce qu'elles mettent en oeuvre une séquence d'acide nucléique, un polypeptide ou un anticorps selon l'invention.

10 L'invention fournit en effet la séquence des gènes IBD1 et IBD1prox impliqués dans des maladies inflammatoires et/ou immunes, et en particulier les MICI. Un des enseignements de l'invention est de préciser les mutations dans ces séquences nucléiques ou polypeptidiques, qui sont liées à un phénotype correspondant à une des ces maladies inflammatoires et/ou immunes.

15 On peut détecter ces mutations directement par analyse de l'acide nucléique et des séquences selon l'invention (ADN génomique, ARN, ou ADNc), mais également par l'intermédiaire des polypeptides selon l'invention. En particulier, l'utilisation d'un anticorps selon l'invention qui reconnaît un épitope portant une mutation permet de discriminer entre une protéine « saine » et une protéine  
20 « associée à une pathologie ».

Ainsi, l'étude du gène IBD1 dans diverses maladies inflammatoires et/ou immunes humaines montre ainsi qu'il existe des variants de séquence de ce gène dans la maladie de Crohn, la rectocolite hémorragique et le syndrome de Blau, comme démontré par les exemples. Ces variations de séquence aboutissent à des  
25 variations importantes de la séquence protéique déduite. En effet, elles sont soit localisées sur des sites très conservés de la protéine dans des domaines fonctionnels importants, soit elles aboutissent à la synthèse d'une protéine tronquée. Il est donc extrêmement probable que ces altérations entraînent une modification de la fonction de la protéine et aient donc un effet causal dans la survenue de ces maladies.

30 La variété des maladies où sont observées ces mutations suggère que le gène IBD1 est potentiellement important dans de nombreuses maladies inflammatoires et/ou immunes. Ce résultat est à rapprocher du fait que la région péricentromérique du chromosome 16 a été décrite comme contenant des gènes de susceptibilité à



diverses maladies humaines telles que la spondylarthrite ankylosante ou le rhumatisme psoriasique. On peut donc considérer qu'IBD1 a un rôle important dans un grand nombre de maladies inflammatoires et/ou immunes.

En particulier, on peut associer IBD1 aux maladies inflammatoires  
5 granulomateuses. En effet, le Syndrome de Blau et la MC sont des maladies faisant partie de cette famille. On espère donc trouver des variations dans le gène IBD1 pour les autres maladies de la même famille (sarcoïdose, maladie de Behçet...).

De plus, l'implication de IBD1 dans les voies cellulaires aboutissant à l'apoptose soulève la question de son éventuel rôle carcinogène. En effet, il est  
10 attendu qu'une dysrégulation de IBD1 puisse aboutir à une prédisposition cancéreuse. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'il existe une prédisposition au cancer du colon dans les maladies inflammatoires de l'intestin. IBD1 pourrait en partie expliquer cette susceptibilité au cancer et définir de nouvelles voies de carcinogenèse.

La description précise des mutations observables dans le gène IBD1 permet  
15 ainsi de poser les bases d'un diagnostic moléculaire des maladies inflammatoires et immunes où son rôle est démontré. Une telle démarche, basée sur la recherche de mutations dans le gène, permettra de contribuer au diagnostic de ces maladies et éventuellement de réduire l'importance de certains examens complémentaires  
20 invasifs ou coûteux. L'invention pose les bases d'un tel diagnostic moléculaire basé sur la recherche de mutations dans IBD1.

Le diagnostic moléculaire des maladies inflammatoires devrait aussi permettre d'améliorer la classification nosologique de ces maladies et de mieux définir des sous-groupes de malades particuliers par leur caractéristiques cliniques,  
25 l'évolutivité de la maladie ou la réponse à certains traitements. A titre d'exemple, le démembrement des mutations existantes pourrait ainsi permettre de classer les colites actuellement indéterminées qui représentent plus de 10% des maladies inflammatoires de l'intestin. Une telle démarche permettra de proposer une prise en charge précoce adaptée à chaque patient. D'une manière générale, une telle  
30 démarche permet d'espérer pouvoir définir à terme une prise en charge individualisée de la maladie, en fonction du terrain génétique de chaque malade, incluant des mesures curatives et préventives.

En particulier, on préfère une méthode de diagnostic et/ou d'évaluation pronostique d'une maladie inflammatoire ou d'un cancer caractérisée en ce qu'on détermine à partir d'un prélèvement biologique d'un patient la présence d'au moins une mutation et/ou une altération d'expression du gène correspondant à SEQ ID N° 1 ou SEQ ID N° 4 par l'analyse de tout ou partie d'une séquence nucléique correspondant audit gène. On peut aussi étudier les gènes SEQ ID N° 3 ou SEQ ID N° 6.

Cette méthode de diagnostic et/ou d'évaluation pronostique peut être utilisée de façon préventive (étude d'une prédisposition à ces maladies inflammatoires ou au cancer), ou afin de servir à l'établissement et/ou la confirmation d'un état clinique chez un patient.

De préférence, la maladie inflammatoire est une maladie inflammatoire du tube digestif, et le cancer est un cancer du tube digestif (intestin grêle ou colon).

L'enseignement de l'invention permet en effet de connaître les mutations présentant un déséquilibre de liaison avec les maladies inflammatoires du tube digestif, et qui sont donc associées à de telles maladies.

L'analyse peut être effectuée par séquence de tout ou partie du gène, ou par d'autres méthodes connues de l'homme du métier. On peut en particulier utiliser des méthodes basées sur la PCR, par exemple la PCR-SSCP qui permet de détecter des mutations ponctuelles.

On peut également effectuer l'analyse par fixation d'une sonde selon l'invention correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 1, 3, 4 ou 6 sur une puce à ADN et l'hybridation sur ces microplaques. Une puce à ADN contenant une séquence selon l'invention est également un des objets de l'invention.

De même, une puce à protéines contenant une séquence d'acides aminés selon l'invention est aussi un objet de l'invention. Une telle puce à protéines permet l'étude des interactions entre les polypeptides selon l'invention et d'autres protéines ou des composés chimiques, et peut ainsi être utile pour le criblage de composés interagissant avec les polypeptides selon l'invention. On peut également utiliser les puces à protéines selon l'invention pour détecter la présence d'anticorps dirigés contre les polypeptides selon l'invention dans le sérum de patients. On peut aussi mettre en œuvre une puce à protéines contenant un anticorps selon l'invention.

L'homme du métier sait également mettre en œuvre des techniques permettant l'étude de l'altération de l'expression d'un gène, par exemple par l'étude de l'ARNm (en particulier par Northern Blot ou par des expériences de RT-PCR, avec des sondes ou des amorces selon l'invention), ou de la protéine exprimée, en particulier par Western Blot, en utilisant des anticorps selon l'invention.

Le gène testé est de préférence le gène de séquence SEQ ID N° 1, la maladie inflammatoire pour laquelle on cherche à prédire la susceptibilité étant une maladie du tube digestif, en particulier la maladie de Crohn, ou la rectocolite hémorragique. Si l'on cherche à détecter un cancer, il s'agit de préférence du cancer du colon.

L'invention se rapporte également à des procédés d'obtention d'un allèle du gène IBD1, associé à un phénotype détectable, comprenant les étapes suivantes :

- a) obtenir un échantillon d'acide nucléique d'un individu exprimant ledit phénotype détectable ;
- b) mettre en contact ledit échantillon d'acide nucléique avec un agent capable de détecter spécifiquement un acide nucléique codant pour la protéine IBD1 ;
- c) isoler ledit acide nucléique codant pour la protéine IBD1.

Un tel procédé peut être suivi d'une étape de séquence de tout ou partie de l'acide nucléique codant pour la protéine IBD1, ce qui permet de prédire la susceptibilité à une maladie inflammatoire ou d'un cancer.

L'agent capable de détecter spécifiquement un acide nucléique codant pour la protéine IBD1 est avantageusement une sonde d'oligonucléotides selon l'invention, qui peut être formée d'ADN, d'ARN, de PNA, modifiés ou non. Les modifications peuvent inclure un marquage radioactif ou fluorescent, ou être dues à des modifications dans les liaisons entre les bases (phosphorothioates, ou méthylphosphonates par exemple). L'homme du métier connaît les protocoles permettant d'isoler une séquence spécifique d'ADN. L'étape b) du procédé ci-dessus décrit peut également être une étape d'amplification telle que décrite précédemment.

L'invention se rapporte également à un procédé de détection et/ou de dosage d'un acide nucléique selon l'invention dans un échantillon biologique, comprenant les étapes suivantes de mise en contact d'une sonde selon l'invention avec un

échantillon biologique et de détection et/ou dosage de l'hybride formé entre ledit polynucléotide et l'acide nucléique de l'échantillon biologique.

L'homme du métier sait mettre en œuvre un tel procédé, et peut en particulier utiliser une trousse de réactifs comprenant :

- 5 a) un polynucléotide selon l'invention, utilisé en tant que sonde ;
- b) les réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction d'hybridation entre ladite sonde et l'acide nucléique de l'échantillon biologique ;
- 10 c) les réactifs nécessaires à la détection et/ou le dosage de l'hybride formé entre ladite sonde et l'acide nucléique de l'échantillon biologique ;

qui est également un objet de l'invention.

Une telle trousse peut également contenir des contrôles positifs ou négatifs afin d'assurer la qualité des résultats obtenus.

- 15 Toutefois, afin de détecter et/ou doser un acide nucléique selon l'invention, l'homme du métier peut également effectuer une étape d'amplification à l'aide d'amorces choisies parmi les séquences selon l'invention.

- Enfin, l'invention concerne également les composés choisis parmi un acide nucléique, un polypeptide, un vecteur, une cellule, ou un anticorps selon  
20 l'invention, ou les composés obtenus par les procédés de criblage selon l'invention, à titre de médicament, en particulier pour la prévention et/ou le traitement d'une maladie inflammatoire et/ou immune ou d'un cancer, associé à la présence d'au moins une mutation du gène correspondant à SEQ ID N° 1 ou SEQ ID N° 4, de préférence une maladie inflammatoire du tube digestif, en particulier la maladie de  
25 Crohn ou la rectocolite hémorragique.

Les exemples qui suivent permettent de mieux comprendre les avantages de l'invention et ne doivent pas être considérés comme limitant la portée de l'invention.

#### DESCRIPTION DES FIGURES

- 30 Figure 1 : tests de liaison génétique non paramétrique pour la maladie de Crohn dans la région péricentromérique du chromosome 16 (d'après Hugot et al., 1996). Analyse de liaison multipoint basé sur l'identité par descendance pour les marqueurs de la région péricentromérique du chromosome 16. Les distances

génétiq ues entre marqueurs ont été estimées grâce au programme CRIMAP. Le lod score (MAPMAKER/SIBS) est indiqué sur la figure de gauche. Deux tests de pseudo vraisemblance ont été développés et rapportés sur la figure de droite. Le premier (Tz) est analogue au test des moyennes. Le deuxième (Tz2) est analogue au test de la proportion des paires d'affectés partageant deux allèles.

Figure 2 : analyse de liaison génétique multipoint non paramétrique. 78 familles avec plusieurs apparentés atteints de Maladie de Crohn ont été génotypées pour 26 marqueurs de polymorphisme dans la région péri centromérique du chromosome 16. La localisation de chaque marqueur est symbolisée par une flèche. L'ordre des marqueurs et la distance les séparant dérive de l'analyse des données expérimentales avec le logiciel Crimap. Les flèches sous la courbe indiquent les marqueurs SPN, D16S409 et D16S411 utilisés dans la première étude publiée (Hugot et al., 1996). Les flèches situées en haut de la figure correspondent aux marqueurs D16S3136, D16S541, D16S3117, D16S416 et D16S770 localisés au maximum du test de liaison génétique. Les données de typage ont été analysées à l'aide du programme d'analyse multipoint non paramétrique du logiciel Genehunter version 1.3. Le maximum du NPL Score est de 3,33 ( $p=0,0004$ ).

Figure 3 : représentation schématique de la protéine codée par IBD1. La protéine codée par IBD1 est représentée horizontalement. Les différents domaines qui la composent sont indiqués sur la figure avec le numéro de référence des acides aminés correspondant au début et à la fin de chaque domaine. La protéine est constituée d'un domaine CARD, d'un domaine liant les nucléotides (NBD) et de motifs riches en leucines (LRR).

Figure 4 : représentation schématique de la protéine IBD1/NOD2 dans trois variants associés à MC.

A : Le produit de traduction déduit de la séquence d'ADNc du gène candidat IBD1 est identique à celui de NOD2 (Ogura et al., 2000). Le polypeptide contient 2 domaines CARD (CAspase Recruitment Domains), un domaine de liaison aux nucléotides (NBD) et 10 répétitions de 27 acides aminés, des motifs riches en leucine (LRR). La séquence consensus du site du motif A (boucle P) liant l'ATP/GTP du NBD est indiquée par un cercle noir. Les changements de séquences codés par les trois principaux variants associés à MC sont SNP 8 (R675W), SNP 12 (G881R) et SNP 13 (déplacement de cadre 980). Le déplacement de cadre change

un codon leucine en un codon proline à la position 980 qui est immédiatement suivi par un codon stop.

B : Variants faux sens rares de NOD2 chez 457 patients MC, 159 patients RCH et 103 individus non apparentés, non atteints. Les positions des variants faux sens  
5 rares sont indiquées pour les trois groupes. L'échelle à gauche indique le nombre de chaque variant identifié dans les groupes faisant l'objet de recherche et celle à droite mesure la fréquence de la mutation. Les fréquences alléliques du polymorphisme V928I n'étaient pas significativement différentes( 0,92 : 0,08) dans  
10 Weinberg.

### EXEMPLES

#### Exemple 1 : localisation fine de IBD1

La première étape vers l'identification du gène IBD1 a été de réduire la taille  
15 de la région génétique d'intérêt, initialement centrée sur le marqueur D16S411 situé entre D16S409 et D16S419 (Hugot et al., 1996 et fig. 1). Un groupe de marqueurs proches (carte génétique à haute résolution) a été utilisé pour mieux préciser la région génétique et a permis de compléter les analyses de liaison génétique et de rechercher un déséquilibre de liaison génétique avec la maladie.

20 L'étude a porté sur 78 familles comportant au moins 2 apparentés atteints de MC, qui correspondaient à 119 paires d'affectés. Les familles comportant des malades atteints de RCH ont été exclues de l'étude.

Vingt-six marqueurs génétiques de polymorphisme de type microsatellites ont été étudiés. Ces marqueurs formaient ensemble une carte à haute résolution avec  
25 une distance moyenne entre marqueurs de l'ordre de 1cM dans la région génétique d'intérêt. Les caractéristiques des marqueurs étudiés sont rapportés sur le tableau 1.

Tableau 1. Marqueurs polymorphes de type microsatellite utilisés pour la localisation fine de IBD1

Nom du marqueur de polymorphisme	Distance cumulée (cM)	Amorces PCR
D16S3120 (AFM326vc5)	0	SEQ ID N° 7 SEQ ID N° 8
D16S298 (AFMa189wg5)	2,9	SEQ ID N° 9 SEQ ID N° 10

D16S299	3,4	SEQ ID N° 11 SEQ ID N° 12
SPN	3,9	SEQ ID N° 13 SEQ ID N° 14
D16S383	4,3	SEQ ID N° 15 SEQ ID N° 16
D16S753 (GGAA3G05)	4,9	SEQ ID N° 17 SEQ ID N° 18
D16S3044 (AFMa222za9)	5,8	SEQ ID N° 19 SEQ ID N° 20
D16S409 (AFM161xa1)	5,8	SEQ ID N° 21 SEQ ID N° 22
D16S3105 (AFMb341zc5)	6,1	SEQ ID N° 23 SEQ ID N° 24
D16S261 (MFD24)	6,8	SEQ ID N° 25 SEQ ID N° 26
D16S540 (GATA7B02)	6,9	SEQ ID N° 27 SEQ ID N° 28
D16S3080 (AFMb068zb9)	7	SEQ ID N° 29 SEQ ID N° 30
D16S517 (AFMa132we9)	7	SEQ ID N° 31 SEQ ID N° 32
D16S411 (AFM186xa3)	8	SEQ ID N° 33 SEQ ID N° 34
D16S3035 (AFMa189wg5)	10,4	SEQ ID N° 35 SEQ ID N° 36
D16S3136 (AFMa061xe5)	10,4	SEQ ID N° 37 SEQ ID N° 38
D16S541 (GATA7E02)	11,4	SEQ ID N° 39 SEQ ID N° 40
D16S3117 (AFM288wb1)	11,5	SEQ ID N° 41 SEQ ID N° 42
D16S416 (AFM210yg3)	12,4	SEQ ID N° 43 SEQ ID N° 44
D16S770 (GGAA20G02)	13,2	SEQ ID N° 45 SEQ ID N° 46
D16S2623 (GATA81B12)	15	SEQ ID N° 47 SEQ ID N° 48
D16S390	16,5	SEQ ID N° 49 SEQ ID N° 50
D16S419 (AFM225zf2)	20,4	SEQ ID N° 51 SEQ ID N° 52
D16S771 (GGAA23C09)	21,8	SEQ ID N° 53 SEQ ID N° 54
D16S408 (AFM137xf8)	25,6	SEQ ID N° 55 SEQ ID N° 56
D16S508 (AFM304xf1)	38,4	SEQ ID N° 57 SEQ ID N° 58

Chaque marqueur est répertorié selon la nomenclature internationale et le plus souvent par le nom proposé par le laboratoire d'origine. Les marqueurs apparaissent selon leur ordre sur le chromosome (de 16p vers 16q). La distance génétique entre les marqueurs (en centiMorgan Kosambi, calculée par le programme Crimap à partir des données expérimentales) est indiquée dans la deuxième colonne. Le premier marqueur polymorphe est pris arbitrairement comme point de référence. Les oligonucléotides ayant servi à la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sont indiqués dans la troisième colonne.

Le génotypage de ces marqueurs microsatellites a reposé sur la technologie des séquenceurs automatiques utilisant des amorces fluorescentes. Brièvement, après amplification, les produits de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) fluorescents ont été déposés sur un gel de polyacrylamide sur séquenceur automatique selon les recommandations du constructeur (Perkin Elmer). La taille des allèles pour chaque sujet a été déduite grâce au logiciels Genescan<sup>R</sup> et Genotyper<sup>R</sup>. Les données ont ensuite été conservées sur une base informatique intégrée contenant les données généalogiques, phénotypiques et génétiques. Elles ont alors été utilisées pour les analyses de liaison génétique.

Plusieurs contrôles qualité ont été réalisés tout au long de la procédure de génotypage:

- double lecture indépendante des données de génotypage,
- utilisation d'un ADN standard servant de contrôle interne pour chaque migration électrophorétique,
- contrôle de la gamme de taille de chaque allèle observé,
- recherche d'erreurs de transmission mendélienne ,
- calcul de la distance génétique entre marqueurs (programme CRIMAP) et comparaison de celle-ci avec les données de la littérature,
- nouveau typage des marqueurs pour lesquels il était observé une recombinaison entre marqueurs proches.

Les données de génotypage ont été analysées par des méthodes de liaison génétique multipoint non paramétrique (Programme GENEHUNTER version 1.3). L'informativité du système de marqueurs était supérieure à 80% pour la région étudiée. Le maximum du test (NPL= 3,33; P = 0,0004) a été obtenu pour les marqueurs D16S541, D16S3117, D16S770 et D16S416 (figure 2).



Les données de typage pour ces 26 marqueurs de polymorphisme ont aussi été analysées à la recherche d'un déséquilibre de transmission. Deux groupes de 108 et 76 familles avec un ou plusieurs malades atteints de MC ont été étudiés. Le test statistique de déséquilibre de transmission a été décrit par Spielman et al. (1993). Il n'a été pris en compte dans ce travail qu'un seul malade par famille et la valeur de  $p$  a été corrigée par le nombre d'allèles testés pour chaque marqueur étudié.

Un déséquilibre de transmission a été observé pour les allèles 4 et 5 (taille 205, resp. 207 paires de bases) du marqueur D16S3136 ( $p=0,05$ , resp.  $p=0,01$ ).

Ces résultats suggestifs d'une association entre le marqueur D16S3136 et la MC ont conduit à construire une cartographie physique de la région génétique centrée sur D16S3136 et à établir la séquence d'un segment d'ADN génomique de grande taille (BAC) contenant ce site polymorphe. Il a alors été possible d'identifier et d'analyser un plus grand nombre de marqueurs de polymorphisme dans le voisinage de D16S3136 ainsi que de définir et d'étudier les séquences transcrites présentes dans la région.

#### Exemple 2 : cartographie physique de la région IBD1

Un contig de fragments d'ADN génomique, centré sur les marqueurs D16S3136, D16S3117, D16S770 et D16S416, a été généré à partir des banques d'ADN génomique humain de la fondation Jean Dausset/CEPH. Les segments d'ADN chromosomique ont été identifiés à partir de certains marqueurs de polymorphisme utilisés dans la cartographie génétique fine (D16S411, D16S416, D16S541, D16S770, D16S2623, D16S3035, D16S3117 et D16S3136). Pour chaque marqueur, une banque de chromosomes artificiels de bactéries (BAC) a été criblée par PCR à la recherche de clones contenant la séquence du marqueur. Selon que les séquences testées étaient ou non présentes sur les clones de BAC il a été alors possible d'organiser les clones entre eux à l'aide du logiciel Segmap version 3.35.

On a pu établir, pour les BACs, une organisation continue (contig) couvrant la région génétique d'intérêt, selon une méthode connue de l'homme du métier (Rouquier et al., 1994 ; Kim et al., 1996 ; Asakawa et al., 1997). Pour ce faire, les extrémités des BACs identifiés ont été séquencées et ces nouvelles données de séquence ont alors servi à cribler itérativement les banques de BACs. A chaque criblage, le contig de BAC a alors progressé d'un pas jusqu'à l'obtention d'un

continuum de clones chevauchants. La taille de chaque BAC participant au contig a été déduite de son profil de migration sur gel d'agarose en champ pulsé.

On a ainsi construit un contig de BAC contenant 101 BACs et s'étendant sur une distance globale de plus de 2,5 Mb avec une redondance moyenne de 5,5 BAC  
5 à chaque point du contig. La taille moyenne des BAC est de 136kb.

### Exemple 3 : séquençage du BAC hb87b10

Le BAC de ce contig contenant le marqueur de polymorphisme D16S3136 (appelé hb87b10), dont la taille était de 163761 bp a été séquencé selon la méthode dite du "coup de fusil". En bref, l'ADN du BAC a été fragmenté par sonication. Les  
10 fragments d'ADN ainsi générés ont été soumis à une électrophorèse en gel d'agarose et ceux dont la taille était supérieure à 1,5 kb ont été élus pour être analysés. Ces fragments ont ensuite été clonés dans le phage m13 lui même introduit dans des bactéries rendues compétentes par électroporation. Après culture, l'ADN des clones  
15 a été récupéré et séquencé par des méthodes de séquençage automatique à l'aide d'amorces fluorescentes du vecteur m13 sur séquenceur automatique.

1526 séquences différentes d'une taille moyenne de 600 bp ont été générées, qui ont été organisées entre elles grâce au logiciel Polyphredphrap<sup>R</sup> aboutissant à un contig de séquence couvrant l'ensemble du BAC. La séquence ainsi générée avait  
20 une redondance moyenne de 5,5 équivalents génomiques. Les rares (n=5) intervalles de séquence non représentés dans la banque de clones m13 ont été comblés en générant des amorces de PCR spécifiques, de part et d'autre de ces intervalles, et en analysant le produit de PCR dérivé de l'ADN génomique d'un sujet sain.

25 Des homologues de séquence avec des séquences disponibles dans les bases de données génétiques publiques (Genbank) ont été recherchées. Aucun gène connu n'a pu être identifié dans cet intervalle de 163 kb. Plusieurs EST ont été positionnés suggérant que des gènes inconnus étaient contenus dans cette séquence. Ces EST issus des bases de données génétiques publiques (Genbank, GDB, Unigene, dbEST)  
30 portaient les références suivantes : AI167910, AI011720, Rn24957, Mm30219, hs132289, AA236306, hs87296, AA055131, hs151708, AA417809, AA417810, hs61309, hs116424, HUMGS01037, AA835524, hs105242, SHGC17274, hs146128, hs122983, hs87280 et hs135201. La recherche d'exons putatifs à l'aide

du programme informatique GRAIL a permis d'identifier plusieurs exons potentiels, sites de polyadénylation et séquences promotrices.

Exemple 4 : études de déséquilibre de transmission

- 5 12 marqueurs de polymorphisme bialléliques (SNP) ont été identifiés dans une région s'étendant sur environ 250 kb et centrée sur le BAC hb87b10. Ces polymorphismes ont été générés par analyse de la séquence d'une dizaine de malades indépendants atteints de MC. Le séquençage a été le plus souvent réalisé au niveau d'EST connus et positionnés sur le BAC ou à son voisinage. Des exons
- 10 putatifs, prédits par le programme informatique GRAIL ont aussi été analysés. Les caractéristiques des marqueurs polymorphes ainsi identifiés sont rapportées sur le tableau 2.

Tableau 2. Caractéristiques de marqueurs de polymorphisme bialléliques étudiés dans la région de IBD1

I	II	III	IV	V	VI
1	KIAA0849ex9	PCR-AS		SEQ ID N° 88 à 90	116
2	hb27G11F	PCR-RFLP	<i>BsrI</i>	SEQ ID N° 86, 87	185 116 69
3	Ctg22Ex1	PCR-RFLP	<i>RsaI</i>	SEQ ID N° 84, 85	381 313 69
4	SNP1	PCR-AS		SEQ ID N° 81 à 83	410
5	ctg2931-3ac/ola	LO		SEQ ID N° 78 à 80	51 49
6	ctg2931-5ag/ola	LO		SEQ ID N° 75 à 77	44 42
7	SNP3-2931	PCR-AS		SEQ ID N° 72 à 74	245
8	Ctg25Ex1	PCR-RFLP	<i>BstEII</i>	SEQ ID N° 70, 71	207 122 85

9	CTG35 ExA	PCR-AS		SEQ ID N° 67 à 69	333
10	ctg35 ExC	PCR-AS		SEQ ID N° 64 à 66	198
11	D16S3136			SEQ ID N° 37, 38	
12	hb133D1f	PCR-RFLP	<i>TaqI</i>	- SEQ ID N° 62, 63	369 295 74
13	D16S3035			SEQ ID N°35, 36	
14	ADCY7 int7	PCR-AS		SEQ ID N° 59 à 61	140

PCR-AS : PCR-allèle spécifique ; LO : Ligature d'oligonucléotides

Les 12 marqueurs de polymorphisme bialléliques nouvellement décrits dans ce travail sont répertoriés dans ce tableau. Pour chacun d'eux sont indiqués :

- 5        - le locus (colonne I)
- le nom (colonne II)
- la technique de génotypage utilisée (colonne III)
- l'enzyme de restriction éventuellement utilisée (colonne IV)
- 10       - les amorces oligonucléotidiques utilisées pour la réaction de polymérisation en chaîne ou pour la ligature (colonne V)
- la taille des produits attendus lors du typage (colonne VI)

199 familles comportant 1 ou plusieurs malades atteints de MC ont été typées pour ces 12 marqueurs de polymorphisme ainsi que pour les marqueurs D16S3035 et D16S3136 localisés sur le BAC hb87b10. Les familles comportant des  
15 malades atteints de RCH n'ont pas été prises en compte. Les méthodes de typage des polymorphismes étudiés ont été variables en fonction du type de polymorphisme faisant appel à :

- 20       - la technique de PCR-RFLP (amplification suivie de digestion enzymatique du produit de PCR) quand le polymorphisme était situé sur un site de restriction enzymatique.
- PCR avec amorces spécifiques du site polymorphe : amplification différentielle des deux allèles en utilisant des amorces spécifiques de chaque allèle.

- Test de ligation d'oligonucléotides : ligation différentielle utilisant des oligonucléotides spécifiques de chaque allèle, suivie d'électrophorèse en gel de polyacrylamide.

Les données de typage ont ensuite été analysées selon un test de déséquilibre  
5 de transmission (programme informatique TDT du logiciel GENEHUNTER version  
2). Pour les familles comportant plusieurs apparentés atteints, un seul malade a été  
pris en compte pour l'analyse. En effet, la prise en compte de plusieurs malades  
apparentés pose le problème de non indépendance des données dans les calculs  
statistiques et peut induire une inflation de la valeur du test. Le malade servant à  
10 l'analyse a été tiré au sort au sein de chaque famille par une procédure automatique  
de randomisation. Compte tenu de cette randomisation, la valeur du test statistique  
obtenu ne représentait qu'un seul échantillon possible issu du groupe de familles  
étudiées. Afin de ne pas limiter l'analyse à ce seul échantillon possible et pour  
mieux appréhender la robustesse des résultats obtenus, pour chaque test, une  
15 centaine d'échantillons aléatoires ont ainsi été générés et analysés.

Les marqueurs ont été étudiés séparément puis groupés selon leur ordre sur  
le segment chromosomique (KIAA0849ex9 (locus 1), hb27G11F (locus 2),  
Ctg22Ex1 (locus 3), SNP1 (locus 4), ctg2931-3ac/ola (locus 5), ctg2931-5ag/ola  
(locus 6), SNP3-2931 (locus 7), Ctg25Ex1 (locus 8), CTG35ExA (locus 9),  
20 ctg35ExC (locus 10), d16s3136 (locus 11), hb133D1f (locus 12), D16S3035 (locus  
13), ADCY7int7 (locus 14)) (tableau 2). Les haplotypes comportant 2, 3 et 4  
marqueurs consécutifs ont ainsi été analysés en utilisant toujours la même stratégie  
(100 échantillons aléatoires en prenant pour chaque famille un seul individu atteint).

Pour chaque échantillon testé, il n'a été pris en compte que les génotypes (ou  
25 haplotypes) portés par au moins 10 chromosomes parentaux. En moyenne 250 tests  
différents ont ainsi été réalisés pour chaque échantillon. Il a alors été possible de  
déduire le nombre de tests attendus positifs pour chaque seuil de signification et de  
comparer cette distribution à la distribution observée. Pour les sujets sains, la  
distribution des tests n'est pas différente de celle attendue selon le hasard ( $\chi^2 = 2,85$ ,  
30 ddl=4, p=0,58). Pour les sujets malades, au contraire, il existe un excès de tests  
positifs témoignant de l'existence d'un déséquilibre de transmission dans la région  
étudiée.

Les résultats des tests de déséquilibre de transmission pour chaque marqueur de polymorphisme pris isolément et pour les haplotypes montrant les plus forts déséquilibres de transmission ont montré que les marqueurs suivants sont en déséquilibre de liaison avec la maladie: Ctg22Ex1 (locus 3), SNP1 (locus 4),  
5 ctg2931-5ag/ola (locus 6), SNP3-2931 (locus 7), Ctg25Ex1 (locus 8) et ctg35ExC (locus 10). Ces marqueurs s'étendent sur une région d'environ 50kb (positions 74736 à 124285 sur la séquence de hb87b10).

Les haplotypes les plus fortement associés avec la maladie de Crohn s'étendent eux aussi sur cette région. Ainsi, pour la majorité des échantillons  
10 aléatoires, le test de transmission était positif ( $p < 0,01$ ) pour des haplotypes combinant les marqueurs suivants :

- locus 5-6, locus 6-7, locus 7-8, locus 8-9, locus 9-10, locus 10-11
- locus 5-6-7, locus 6-7-8, locus 7-8-9, locus 8-9-10, locus 9-10-11
- locus 5-6-7-8; locus 6-7-8-9, locus 7-8-9-10,

15 L'haplotype de susceptibilité le plus à risque est défini par les locus 7 à 10. Il s'agit de l'haplotype 1-2-1-2 (tableau 2).

Les marqueurs testés sont, comme attendu, le plus souvent en déséquilibre de liaison entre eux.

Plus récemment, un nouveau test, le Pedigree Disequilibrium Test (PDT),  
20 publié en juillet 2000 (Martin et al., 2000) a été utilisé pour mieux appréhender la signification des résultats obtenus avec le programme informatique TDT. Cette nouvelle statistique permet en effet d'utiliser l'ensemble de l'information disponible dans une famille, tant à partir des sujets malades qu'à partir des sujets sains et de pondérer l'importance de chaque apparenté en une statistique globale pour chaque  
25 famille. Les valeurs de p correspondant aux tests PDT et obtenues pour un groupe élargi de 235 familles avec un ou plusieurs apparentés atteints de la maladie de Crohn sont rapportées dans le Tableau 3. Cette nouvelle analyse confirme que la région du BAC hb87b10 est bien associée avec la maladie de Crohn.

Tableau 3. Résultat des tests PDT réalisés sur 235 familles atteintes de la maladie de Crohn (NS : non significatif)

LOCUS	VALEUR p DU TEST PDT
KIAA0849ex9	NS
hb27g11f	0,05
ctg22ex1	0,01
SNP1	0,001
ctg2931-3ac/ola	NS
ctg2931-5ag/ola	0,0001
SNP3-2931	0,0001
ctg25ex1	0,0006
ctg35exA	NS
ctg35exC	0,00002
D16S3136	NS
hb133d1f	NS
D16S3035	NS

Exemple 5 : Identification du gène IBD1

- 5 Les groupements d'EST (références Unigene : Hs 135201, Hs87280, Hs122983, Hs146128, Hs105242, Hs116424, Hs61309, Hs151708, Hs 87296 et Hs132289) publiés et présents sur le BAC hb87b10 ont été étudiés à la recherche d'une séquence d'ADN complémentaire (ADNc) plus complète. Pour IBD1prox, les clones disponibles dans les banques publiques ont été séquencés et les séquences
- 10 organisées entre elles. Pour IBD1, une banque d'ADN complémentaire de sang périphérique (Stratagene human blood cDNA lambda zapexpress ref 938202) a été criblée par les produits de PCR générés à partir des EST connus selon les modalités proposées par le fabricant. La séquence des ADNc ainsi identifiés a ensuite servi à un nouveau criblage de la banque d'ADNc et ainsi de suite jusqu'à l'obtention de
- 15 l'ADNc présenté.

L'EST hs135201 (UniGene) a permis d'identifier un ADNc ne figurant pas sur les bases de données génétiques disponibles (Genbank) Il correspond donc à un nouveau gène humain. La comparaison de la séquence du cDNA et de l'ADN génomique a montré que ce gène est constitué de 11 exons et 10 introns. Un exon

supplémentaire, en position 5' par rapport au cDNA identifié est prédit par l'analyse de la séquence avec le logiciel Grail. Ces exons sont très homologues avec les premiers exons du gène CARD4/NOD1. Considérant l'ensemble des exons identifiées et l'exon putatif supplémentaire, ce nouveau gène apparaît avoir une  
5 structure génomique très proche de celle de CARD4/NOD1. Par ailleurs, en amont du premier exon putatif figure un site d'initiation de la transcription. Pour l'ensemble de ces raisons, l'exon putatif a été considéré comme participant à ce nouveau gène. L'ADNc reporté en annexe (SEQ ID N° 1) comporte donc l'ensemble de la séquence identifiée plus la séquence prédite par la modélisation informatique,  
10 l'ADN complémentaire débutant arbitrairement au premier codon ATG de la séquence codante prédite. Sur cette base, le gène comporterait donc 12 exons et 11 introns. La structure intron-exon du gène est rapportée sur la SEQ ID N° 3.

La séquence protéique déduite de la séquence nucléotidique, comporte 1041 acides aminés (SEQ ID N° 2). Cette séquence n'a pas non plus été retrouvée sur les  
15 bases de données biologiques (Genpept, pir, swissprot).

Or, plus récemment, l'exon putatif ci-dessus décrit n'a pas pu être confirmé. Le gène IBD1 ne comporte donc effectivement que 11 exons et 10 introns et code pour une protéine de 1013 acides aminés (c'est-à-dire 28 acides aminés de moins que déterminé initialement).

20 L'étude de la séquence protéique déduite montre que ce gène contient trois domaines fonctionnels différents (figure 3) :

- Un domaine CARD (Caspase Recruitment Domain) connu pour être impliqué dans l'interaction entre protéines régulatrices de l'apoptose et de l'activation de la voie NFkappa B. Le domaine CARD permet de  
25 classer cette nouvelle protéine dans la famille des protéines CARD dont les membres les plus anciens sont CED 4, APAF1 et RICK.
- Un domaine NBD (Nucléotide Binding Domaine) comportant un site de reconnaissance de l'ATP et un site de liaison du Magnésium. La protéine doit donc avoir une activité kinase très probable.
- 30 - Un domaine LRR (Leucine Rich Domain) supposé participer à l'interaction entre protéines par analogie avec d'autres domaines protéiques décrits.



Par ailleurs, le domaine LRR de la protéine permet d'affilier la protéine à une famille de protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire et présentes tant chez les plantes que chez les animaux.

La comparaison de ce nouveau gène avec les gènes précédemment identifiés et disponibles dans les bases de données publiques montre que celui-ci est très homologue avec CARD4/NOD1 (Bertin et al., 1999 ; Inohara et al., 1999). Cette homologie porte sur la séquence de l'ADN complémentaire, la structure intron-exon du gène et la séquence protéique. L'identité de séquence des 2 ADN complémentaires est de 58%. Une similitude est également observée au niveau de la structure introns-exons. L'homologie de séquence au niveau protéique est de l'ordre de 40%.

La similitude entre ce nouveau gène et CARD4/NOD1 suggère que, comme CARD4/NOD1, la protéine IBD1 est impliquée dans la régulation de l'apoptose et de l'activation de NF-kappa B (Bertin et al., 1999 ; Inohara et al., 1999). La régulation de l'apoptose cellulaire et l'activation de NF-kappa B sont des voies de signalisation intracellulaire essentielles dans les réactions immunitaires. En effet, ces voies de transduction du signal sont les voies effectrices des protéines de la famille du récepteur du TNF (Tumor Necrosis Factor) impliquées dans les interactions cellule-cellule et la réponse cellulaire aux différents médiateurs de l'inflammation (cytokines). Le nouveau gène apparaît donc comme potentiellement important à la réaction inflammatoire, de façon générale.

Plusieurs faisceaux de preuves viennent à l'appui de la dérégulation de NF-kB induit par des bactéries dans la maladie de Crohn. Tout d'abord, la susceptibilité à IBD spontanée chez les souris a été associée à des mutations dans Tlr4, une molécule connue pour se lier aux LPS par l'intermédiaire de son domaine LRR (Poltorak et al., 1998 et Sundberg et al., 1994) et pour être un membre des activateurs de la famille de NF-kB. Deuxièmement, la thérapie antibiotique cause une amélioration provisoire chez les patients atteints de MC accréditant l'hypothèse que les bactéries entériques peuvent jouer un rôle étiologique dans la maladie de Crohn (McKay, 1999). Troisièmement, NF-kB joue un rôle pivot dans les maladies inflammatoires de l'intestin et est activé dans les cellules mononucléées de la lamina propria dans la maladie de Crohn (Schreiber et al., 1998). Quatrièmement, le traitement de la maladie de Crohn est basée sur l'utilisation de la sulfasalazine et

des glucocorticoïdes, tous deux connus comme étant des inhibiteurs de NF- $\kappa$ B (Auphan et al., 1995 et Wahl et al., 1998)

Encore plus récemment, il a été montré que le gène candidat IBD1 code pour une protéine très similaire à NOD2, un membre de la superfamille CED4/APAF1 (Ogura et al., 2000). Les séquences nucléotidiques et protéiques de IBD1 et NOD2 ne divergent en réalité que pour une petite portion toute initiale des 2 séquences rapportées. Les expressions tissulaires de Nod2 et IBD1 sont de plus superposables. Ces deux gènes (protéines) peuvent donc être considéré(e)s comme identiques. Il a été démontré que le domaine LRR de Nod2 a une activité de liaison pour les lipopolysaccharides bactériens (LPS) (Inohara et al., 2000) et que sa délétion stimule la voie de NF $\kappa$ B. Ce résultat confirme les données de l'invention.

L'expression tissulaire de IBD1 a été ensuite étudiée par la technique du Northern Blot. Un transcrit de 4.5 kb est visible dans la plupart des tissus humains. La taille du transcrit est conforme avec la taille prédite par l'ADNc. Le transcrit de 4.5 kb semble en très faible abondance dans l'intestin grêle et le colon. Il est par contre très fortement exprimé dans les globules blancs. Ceci est en accord avec des données cliniques sur les transplantations qui suggèrent que la maladie de Crohn est potentiellement une maladie liée aux cellules immunitaires circulantes. En effet, la transplantation intestinale n'empêche pas la récurrence sur le greffon dans la maladie de Crohn tandis que la transplantation de moelle osseuse semble avoir un effet bénéfique sur l'évolution de la maladie.

Certaines données font également penser à un épissage alternatif, qui pourrait s'avérer un élément important dans la possibilité de générer des mutants qui pourraient jouer un rôle dans le développement de maladies inflammatoires.

Le promoteur du gène IBD1 n'est actuellement pas identifié avec précision. Il est cependant raisonnable de penser, par analogie avec un très grand nombre de gènes que celui-ci réside, au moins pour partie, immédiatement en amont du gène, dans la portion 5' de celui-ci. Cette région génétique contient des séquences transcrites comme en témoigne la présence d'EST (HUMGS01037, AA835524, hs.105242, SHGC17274, hs.146128, hs.122983, hs.87280). Les clones ATCC contenant ces séquences ont été séquencés et analysés dans le laboratoire, permettant de mettre en évidence une organisation en exons et en introns avec d'éventuels épissages alternatifs. Ces données suggèrent l'existence d'un autre gène

(nommé IBD1prox en raison de sa proximité d'IBD1). La séquence partielle de l'ADN complémentaire de IBD1prox est rapportée (SEQ ID N° 4) de même que sa structure intron-exon sur la SEQ ID N° 6.

La traduction des ADNc correspondant à IBD1prox aboutit à une protéine contenant une homéobox. L'analyse de plusieurs ADNc du gène suggère cependant l'existence d'épissages alternatifs. IBD1prox, selon un des épissages alternatifs possibles correspond à l'EST anonyme HUMGS01037 dont l'ARN est exprimé de manière plus importante dans les lignées leucocytaires différenciées que dans les lignées non différenciées.

Ainsi, il est possible que ce gène puisse avoir un rôle dans l'inflammation et la différenciation cellulaire. Il peut donc lui aussi être considéré comme un bon candidat pour la susceptibilité aux MICI. L'association entre MC et le polymorphisme ctg35 ExC localisé sur la séquence codante de IBD1prox renforce cette hypothèse même si ce polymorphisme n'entraîne pas de variation de séquence au niveau protéique.

Enfin, plus récemment, l'existence d'une liaison génétique dans les familles atteintes de la maladie de Crohn et ne comportant pas de mutation du gène IBD1 suggère elle aussi que IBD1 prox a un rôle additionnel à IBD1 dans la prédisposition génétique à la maladie.

La relation fonctionnelle entre IBD1 et IBD1prox n'est actuellement pas établie. Toutefois, la forte proximité entre les deux gènes pourrait refléter une interaction entre ceux-ci. Dans ce cas, la localisation « tête -bêche » de ces gènes suggère qu'ils puissent avoir des modes de régulation communs ou interdépendants.

#### Exemple 6 : identifications de mutations du gène IBD1 dans les maladies inflammatoires

Afin de confirmer le rôle de IBD1 dans les maladies inflammatoires, la séquence codante et les jonctions intron-exon du gène ont été séquencées de l'exon 2 à l'exon 12 inclus chez 70 sujets indépendants, à savoir : 50 malades atteints de MC, 10 malades atteints de RCH, 1 malade atteint de syndrome de Blau et 9 témoins sains. Les malades étudiés étaient pour la plupart des formes familiales de la maladie et étaient souvent porteurs de l'haplotype de susceptibilité défini par les

études de déséquilibre de transmission. Les témoins sains étaient d'origine caucasienne.

24 variants de séquence ont ainsi pu être identifiés sur ce groupe de 70 personnes non apparentées (tableau 3).

- 5 La nomenclature des mutations rapportées fait référence à la séquence initiale de la protéine comportant 1041 acides aminés. La nomenclature plus récemment proposée est aisément déduite en retirant 28 acides aminés à la séquence initiale, et correspond donc à une protéine comprenant 1013 acides aminés (cf exemple 5).

10

Tableau 4. Mutations observées dans le gène IBD1

Exon	Variant nucléotidique	Variant protéique	Maladie de Crohn	Rectocolite hémorragique	Témoins sains
1	non testé				
2	G417A	silencieux			
2	C537G	silencieux			
3	aucun				
4	T805C	S269P	48/100	6/20	3/18
4	A869G	N290S	0	0	1/18
4	C905T	A302V	1/100	0	0
4	C1283T	P428L	1/100	0	0
4	C1284A	silencieux			
4	C1287T	silencieux			
4	T1380C	silencieux			
4	T1764G	silencieux			
4	G1837A	A613T	1/100	0	0
4	C2107T	R703W	10/10	1/20	1/18
4	C2110T	R704C	4/10	1/20	0
5	G2365A	R792Q	1/100	0	0
5	G2370A	V794M	0	1/20	0
5	G2530A	E844K	1/10	0	0
6	A2558G	N853S	1/100	0	0
6	A2590G	M864V	1/100	0	0
7	aucun				
8	G2725C	G909R	7/100	0	0
8	C2756A	A919D	1/100	0	0
9	G2866A	V956I	2/100	1/20	3/18
10	C2928T	silencieux			
11	3022insC	stop	20/100	0	0

12	aucun				
----	-------	--	--	--	--

Les mutations autres que silencieuses observées dans chaque exon sont rapportées. Elles sont indiquées par la variation de la chaîne peptidique. Pour chaque mutation et pour chaque phénotype étudié, il est indiqué le nombre de fois où la mutation est observé, rapporté au nombre de chromosomes testés.

5       Aucun variant de séquence fonctionnel n'a été identifié dans les exons 1 à 3 (correspondants au domaine CARD de la protéine). Les exons 7 et 12 n'ont pas non plus montré de variation de séquence. Certains variants correspondaient à des polymorphismes déjà identifiés et typés pour les études de déséquilibre de transmission, à savoir :

- 10       -Snp3-2931 : variant nucléotidique T805C, variant protéique S269P  
       -ctg2931-5ag/ola : variant nucléotidique T1380C (silencieux)  
       -ctg2931-3ac/ola : variant nucléotidique T1764G (silencieux)  
       -SNP1 : variant nucléotidique C2107T, variant protéique R703W

15       Plusieurs variations de séquence étaient silencieuses (G417A, C537G, C1284A, C1287T, T1380C, T1764G, C2928T) et n'entraînaient pas de modification de la séquence protéique. Elles n'ont pas été étudiées davantage ici.

20       Pour les 16 variations de séquence non silencieuses, il a été observé des variants de séquence protéique chez 43/50 MC contre 5/9 témoins sains et 6/10 RCH. L'existence d'une ou plusieurs variation(s) de séquence apparaissait associée au phénotype MC. Il existait souvent plusieurs variations de séquence chez un même individu atteint de MC suggérant un effet parfois récessif du gène pour la MC. A l'inverse, aucun homozygote ou hétérozygote composite n'était observé parmi les patients atteints de RCH ou parmi les témoins sains.

25       Certains variants non silencieux étaient présents à la fois chez les malades atteints de RCH ou de MC et chez les sujets sains. Il s'agissait des variants S269P, N290S, R703W et V956I situés dans les exons 2, 4 et 9. Un complément d'information semble donc nécessaire avant de retenir un éventuel rôle fonctionnel à ces variants de séquence.

30       V956I est une variation de séquence conservative (acides aminés aliphatiques).

Le variant de séquence S269P correspond à une variation de classe d'acide aminé (hydroxylé en immunoacide) au début du domaine liant les nucléotides. Il en

déséquilibre de transmission avec la MC. Il s'agit en effet du polymorphisme Snp3 (Cf. supra).

R703W aboutit à une modification de la classe de l'acide aminé (aromatique au lieu de basique). Cette modification survient dans la région intermédiaire entre  
5 les domaines NBD et LRR, région conservée entre IBD1 et CARD4/NOD1. Un rôle fonctionnel peut donc être suspecté pour ce polymorphisme. Cette variation de séquence (correspondant au site polymorphe Snp1) est plus souvent transmise aux malades atteints de MC que ne le veut le hasard (Cf. supra) confirmant que ce polymorphisme est associé à la MC. Il est possible que la présence de ce mutant  
10 chez les sujets sains témoigne d'une pénétrance incomplète de la mutation comme cela est attendu pour les maladies génétiques complexes telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Le variant R704C, situé immédiatement à côté de R703W a pu être identifié à la fois dans la MC et dans la RCH. Il correspond lui aussi à une variation non  
15 conservative de la protéine (acide aminé soufre au lieu de basique) sur la même région protéique, suggérant un effet fonctionnel aussi important pour R704C que pour R703W.

D'autres variations de séquence sont spécifiques de la MC de la RCH ou du syndrome de Blau.

20 Certaines variations de séquence sont au contraire rares, présentes chez un ou quelques malades (A613T, R704C, E844K, N853S, M864V, A919D). Il s'agit toujours de variations entraînant des modifications non conservatives de la protéine dans des domaines leucine riches, à des positions importantes au sein de ces domaines. Ces différents éléments suggèrent que ces variations ont un rôle  
25 fonctionnel.

Deux variations de séquence (G909R, L1008P\*) sont retrouvées chez un assez grand nombre de maladies de Crohn (respectivement 7/50 et 16/50) alors qu'elles ne sont pas détectées chez les témoins ou chez les malades atteints de RCH.

La délétion/insertion d'une guanosine au niveau du codon 1008 aboutit à une  
30 transformation de la troisième leucine de l'hélice alpha du dernier LRR en proline suivie d'un codon STOP (L1008P\*). Cette variation de séquence entraîne donc une modification importante de la protéine : réduction de taille de la protéine (protéine possédant un domaine LRR tronqué) et altération d'un acide aminé très conservé

(Leucine). Cette modification de séquence est associée à la MC comme en témoigne une étude de déséquilibre de transmission dans 16 familles porteuses de la mutation ( $P=0,008$ ).

La mutation G909R survient sur le dernier acide aminé du sixième motif LRR. Il remplace un acide aminé aliphatique en acide aminé basique. Cette variation est potentiellement importante compte tenu du caractère habituellement neutre ou polaire des acides aminés en position terminale des motifs leucine riche (tant pour IBD1 que pour NOD1/CARD4) et du caractère conservé de cet acide aminé sur les protéines IBD1 et NOD1/CARD4.

Dans le syndrome de Blau, les malades ( $n=2$ ) de la famille étudiée étaient porteurs d'une variation de séquence spécifique (L470F), localisée dans l'exon 4 et correspondant au domaine NBD de la protéine. Dans cette série, ce variant de séquence était spécifique du syndrome de Blau.

Dans la RCH, plusieurs variants de séquence non retrouvés chez les sujets sains ont aussi été identifiés. La proportion de malades porteurs d'une mutation était plus modeste que pour la MC, comme attendu compte tenu de la liaison moins fortement établie entre IBD1 et RCH et du caractère supposé moins génétique de cette dernière maladie. Des variations de séquence étaient communes à la MC et à la RCH (R703W, R704C). D'autres au contraire apparaissaient spécifiques de la RCH (V794M). Cette observation permet de confirmer que MC et RCH sont des maladies partageant au moins en partie la même prédisposition génétique. Elle pose les bases d'une classification nosologique des MICI.

L'étude des variants de séquence du gène IBD1 a donc permis d'identifier plusieurs variants ayant un effet fonctionnel très probable (ex : protéine tronquée) et associés à la maladie de Crohn, à la RCH et au syndrome de Blau.

Le promoteur du gène n'est actuellement pas déterminé. Selon toute vraisemblance cependant, celui-ci est probablement situé dans la région 5' en amont du gène. Selon cette hypothèse, les variants de séquence observés dans cette région peuvent avoir un effet fonctionnel. Ceci pourrait expliquer la très forte association entre MC et certains locus polymorphes tels que ctg35 ExC ou Ctg25Ex1.

L'invention fournit ainsi la première description de mutations dans la famille des gènes contenant un domaine CARD chez l'homme. La fréquence de ces mutations dans des maladies inflammatoires variées montre que le gène IBD1 a un

rôle essentiel dans le processus inflammatoire normal et pathologique. Cette invention fournit de nouvelles voies de compréhension et de recherche dans le domaine de la physiopathologie des processus inflammatoires normaux et pathologiques. Elle permet de ce fait d'envisager le développement de nouvelles

5 molécules pharmaceutiques régulant les voies effectrices contrôlées par IBD1 et utiles dans le traitement des maladies inflammatoires et la régulation du processus inflammatoire en général.

10 Exemple 7 : bases d'un diagnostic biologique de susceptibilité à la maladie de Crohn

Plus récemment, 457 patients indépendants atteints de la maladie de Crohn, 159 patients indépendants atteints de rectocolite hémorragique et 103 témoins sains ont été étudiés à la recherche de mutations. Ce travail a permis de confirmer les mutations précédemment rapportées et d'identifier des mutations supplémentaires

15 rapportées sur la figure 4. Les mutations principales ont ensuite été génotypées dans 235 familles atteintes de la maladie de Crohn. Ce travail plus récent est exposé en utilisant comme référence la séquence protéique plus courte (1013 acides aminés, voir exemple 5) mais la nomenclature antérieure des mutations est aisément déduite à partir de cette dernière en ajoutant 28 au chiffre indiquant la position des acides

20 aminés.

Parmi les 5 mutations les plus fréquences, la mutation conservative V928I (anciennement V956I) n'est pas significativement associée à l'une ou l'autre des maladies inflammatoires de l'intestin et ne semble donc pas avoir de rôle important dans la maladie.

25 La mutation S241P (anciennement S269P) est en déséquilibre de liaison avec les autres mutations principales et ne semble pas jouer par elle-même un rôle important dans la susceptibilité aux maladies inflammatoires de l'intestin (données non montrées).

A l'inverse, les 3 autres mutations R675W (anciennement R703W), G881R

30 (anciennement G909R) et 980fs (anciennement L1008P\*) sont significativement associées à la maladie de Crohn mais pas à la rectocolite hémorragique (cf infra). La localisation dans le LRR ou à sa proximité immédiate des 3 mutations fréquentes plaide très fortement pour un mécanisme fonctionnel impliquant ce domaine



protéique, probablement par un défaut de régulation négative de NFkB par la protéine mutée. Les autres mutations sont plus rares (figure 4). Ces mutations cumulées sont présentes chez 17% des sujets atteints de la maladie de Crohn contre respectivement 4 % et 5 % les sujets sains ou atteints de rectocolite hémorragique.

- 5 Un grand nombre des mutations rares sont aussi localisées dans le LRR.

Les études intrafamiliales des trois polymorphismes les plus fréquents dans la maladie de Crohn montrent qu'ils sont tous trois associés à la maladie (tableau 5). Comme attendu, pour une mutation supposée très délétère, le polymorphisme le plus fortement associé est la mutation tronquante. Ces trois polymorphismes sont  
 10 associés de manière indépendante à la maladie de Crohn puisqu'il n'a pas été possible d'identifier sur 235 familles des chromosomes porteurs de plus d'une de ces trois mutations. Le caractère indépendant de ces associations renforce considérablement l'hypothèse que le gène IBD1 est bien impliqué dans la prédisposition génétique à la maladie de Crohn.

15

Tableau 5 : étude des 3 polymorphismes fréquents de IBD1 dans 235 familles atteintes de la maladie de Crohn

MUTATION	VALEUR p DU TEST PDT
R675W	0,001
G881R	0,003
980fs	0,000006

Les études de cas-témoin confirment cette association (tableau 6). Ils  
 20 montrent que les mutations les plus fréquentes dans la maladie de Crohn ne sont pas fréquentes dans la rectocolite hémorragique.

Tableau 6 : étude de cas-témoin des 3 polymorphismes fréquents de IBD1 dans les maladies inflammatoires de l'intestin

MUTATION	NB DE CHROMOSOMES ETUDIÉS	FREQUENCE DE L'ALLELE A RISQUE R675W	FREQUENCE DE L'ALLELE A RISQUE G881R	FREQUENCE DE L'ALLELE A RISQUE 980fs	TOTAL ALLELES A RISQUE
Témoins sains	206	0,04	0,01	0,02	0,07
Rectocolite H.	318	0,03	0,00	0,01	0,05

M Crohn	936	0,11	0,06	0,12	0,29
---------	-----	------	------	------	------

L'étude de l'effet dose de ces mutations montre que les sujets porteurs d'une mutation à l'état homozygote ou hétérozygote composite présentent un bien plu grand risque de développer la maladie que les sujets non porteurs ou hétérozygotes

5 pour ces mutations (tableau 7).

Tableau 7 : risque relatif et absolu de la maladie de Crohn attribuable en fonction du génotype de IBD1

Dans la population générale, un risque de la maladie de Crohn de 0,001 a été pris comme référence et les mutations ont été supposées en équilibre de Hardy-Weinberg.

10

DISTRIBUTION	GENOTYPE			
	AUCUN VARIANT	SIMPLE HETEROZYGOTE	HOMOZYGOTE	HETEROZYGOTE COMPOSITE
Sains	88	15	0	0
Rectocolite H	145	13	1	0
M Crohn	267	133	28	40
Risque attribuable de MC :				
Risque relatif	1	3	38	44
Risque absolu	0,0007	0,002	0,03	0,03

Les travaux cités ci-dessus confirment les données préliminaires antérieures et apportent les bases détaillées d'un diagnostic biologique de la maladie de Crohn par l'étude des variants de IBD1. En effet, ce travail :

15

- 1) définit les mutations dont la fréquence est supérieure à 0,001 dans une population caucasienne mélangée,
  - 2) définit la fréquence des mutations observées et permet de définir 3 mutations principales associées à la maladie de Crohn. Ainsi, il est possible, grâce à ce travail, de définir une stratégie d'étude du gène pour la recherche de variants morbides à savoir : premièrement typage des 3 mutations principales, deuxièmement recherche de mutations dans les 7 derniers exons, troisièmement recherche d'autres variants de séquence.
- 20

- 5 3) définit les modalités pratiques de recherche de ces mutations en signalant leur position et leur nature. En effet, il est ensuite aisé à l'homme du métier de mettre au point des méthodes de typage et de séquençage selon son expertise personnelle. On peut citer en particulier la possibilité de faire les génotypages des 3 mutations principales par PCR suivie de digestion enzymatique et électrophorèse, étude des profils de migration par dHPLC, DGGE ou SSCP, oligoligation, microséquençage, etc.
- 10 4) démontre l'indépendance des mutations les plus fréquentes qui ne sont pas observées sur le même chromosome dans cette population étendue et variée. Cette information permet de classer de façon fiable les sujets en hétérozygotes composites (ayant deux mutations) comme porteur à une double dose de variations intragéniques.
- 15 5) démontre que la plus grande proportion des mutations n'entraîne qu'un effet nul ou minime sur le risque de rectocolite hémorragique. Ce résultat permet d'envisager d'aider le clinicien dans le diagnostic différentiel entre ces deux maladies. En effet, dans environ 10 % des cas, les maladies inflammatoires de l'intestin restent inclassées malgré les examens biologiques, radiologiques et endoscopiques.
- 20 6) définit un risque relatif et absolu de la maladie pour les génotypes les plus fréquents. Ce résultat pose les bases d'un diagnostic prédictif potentiellement utile dans une démarche de suivi ou d'intervention préventive dans les populations à risque, en particulier, les apparentés de malades.
- 25 7) démontre l'existence d'un effet dose pour le gène IBD1 et confirme le caractère en partie récessif de la prédisposition génétique à la maladie de Crohn. Il permet donc de poser les bases d'un conseil génétique et d'un diagnostic préclinique intrafamilial.

30 Notons enfin qu'une mutation supplémentaire du domaine NBD a été isolée dans une deuxième famille porteuse d'un syndrome de Blau. La rareté des deux événements dans 2 familles différentes suffit à confirmer l'implication de ce gène dans le syndrome de Blau et dans les maladies granulomateuses en générale.

L'ensemble de ces données apporte un outil diagnostique directement applicable et utile au praticien dans sa pratique quotidienne.

\* \* \* \* \*

5

Le gène IBD1prox, situé dans la région promotrice de IBD1, et dont la séquence partielle est dévoilée dans la présente invention, peut lui aussi avoir un rôle important dans la régulation de l'apoptose cellulaire et du processus inflammatoire, comme suggéré par son expression différentielle dans les cellules

10 matures du système immunitaire. La forte association rapportée dans ce travail entre le marqueur de polymorphisme ctg35ExC (situé dans la région transcrite du gène) et la maladie de Crohn, plaide aussi très fortement en faveur de cette hypothèse.

Les maladies inflammatoires de l'intestin sont des maladies génétiques complexes pour lesquelles, à ce jour, aucun gène de susceptibilité n'avait été

15 identifié avec certitude. L'invention a permis de l'identification du premier gène de susceptibilité à la maladie de Crohn, par une démarche de clonage positionnel (ou génétique reverse). Il s'agit là de la première localisation génétique obtenue par une telle approche pour une maladie génétique complexe, ce qui démontre son utilité et sa faisabilité, au moins dans certains cas dans les maladies génétiques complexes.

20

La présente invention concerne aussi un acide nucléique purifié ou isolé caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide possédant un fragment continu d'au moins 200 acides aminés d'une protéine choisie parmi SEQ ID N° 2 et SEQ ID N° 5.

### Références

- Auphan et al. (1995) *Science* 270, 286-90.
- Asakawa et al. (1997), *Gene*, 191, 69
- 5 Becker et al. (1998), *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 9979
- Bertin et al. (1999), *J Biol Chem*, 274, 12955
- Buckholz, (1993), *Curr. Op. Biotechnology* 4, 538.
- Carter, (1993) *Curr. Op. Biotechnology* 3, 533.
- Cho et al. (1998), *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 7502.
- 10 Duck et al. (1990), *Biotechniques*, 9, 142.
- Edwards et Aruffo (1993), *Curr. Op. Biotechnology*, 4, 558.
- Epstein (1992) *Médecine/Sciences*, 8, 902.
- Guatelli et al. (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1874.
- Hugot et al. (1996), *Nature*, 379, 821.
- 15 Inohara et al. (1999) *J Biol Chem*, 274, 14560.
- Inohara et al. (2000) *J. Biol. Chem.*
- Kievitis et al. (1991), *J. Virol. Methods*, 35, 273.
- Kim et al., (1996) *Genomics*, 34, 213.
- Köhler et Milstein. (1975) *Nature* 256, 495.
- 20 Kwoh, et al. (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 1173.
- Landegren et al. (1988) *Science* 241, 1077.
- Lander et Kruglyak (1995) *Nat Genet*, 11, 241.
- Luckow (1993), *Curr. Op. Biotechnology* 4, 564.
- Martin et al. (2000), *Am. J. Hum. Genet.* 67 : 146-54.
- 25 Matthews et al. (1988), *Anal. Biochem.*, 169, 1-25.
- McKay (1999) *Gastroenterol.* 13, 509-516.
- Miele et al. (1983), *J. Mol. Biol.*, 171, 281.
- Neddleman et Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48 : 443
- Ogura et al. (2000), *J. Biol. Chem.*
- 30 Olins et Lee (1993), *Curr. Op. Biotechnology* 4 : 520.
- Perricaudet et al. (1992). *La Recherche* 23 : 471.
- Pearson et Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 2444
- Poltorak et al. (1998) *Sciences* 282, 2085-8.

- Rioux et al. (1998) *Gastroenterology*, 115: 1062.
- Rohlmann et al. (1996) *Nature Biotech.* 14 : 1562.
- Rolfs, A. et al. (1991), Berlin : Springer-Verlag.
- Rouquier et al. (1994), *Anal Biochem* 217, 205.
- 5 Sambrook et al. (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
- Satsangi et al. (1996), *Nat Genet*, 14 : 199.
- Schreiber et al. (1998) *Gut* 42, 477-84.
- Segev, (1992), Kessler C. Springer Verlag, Berlin, New-York, 197-205.
- 10 Smith et Waterman (1981) *Ad. App. Math.* 2 : 482
- Stewart et Yound (1984), *Solid phase peptides synthesis*, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2ème éd., (1984).
- Spielman et al. (1993) *Am J Hum Genet*, 52, 506.
- Sundberg et al. (-1994) *Gastroenterology* 107, 1726-35.
- 15 Temin, (1986) *Retrovirus vectors for gene transfer*. In Kucherlapati R., ed. *Gene Transfer*, New York, Plenum Press, 149-187.
- Tromp et al. (1996) *Am J Hum Genet*, 59 : 1097.
- Wahl et al. (1998) *B. J. Clin. Invest.* > 101, 1163-74.
- Walker (1992), *Nucleic Acids Res.* 20 : 1691.

### Revendications

1. Acide nucléique purifié ou isolé, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléique choisie dans le groupe de séquences suivantes :

- 5 a) SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4 et SEQ ID N° 6 ;
- b) la séquence d'un fragment d'au moins 15 nucléotides consécutifs d'une séquence choisie parmi SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4 ou SEQ ID N° 6 ;
- 10 c) une séquence nucléique présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, après alignement optimal avec une séquence définie en a) ou b) ;
- d) une séquence nucléique s'hybridant dans des conditions de forte stringence avec une séquence nucléique définie en a) ou b) ;
- 15 e) la séquence complémentaire ou la séquence d'ARN correspondant à une séquence telle que définie en a), b), c) ou d).

2. Acide nucléique purifié ou isolé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend ou est constitué d'une séquence choisie parmi SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 4, la séquence complémentaire ou la séquence d'ARN correspondant à une de ces séquences.

3. Acide nucléique purifié ou isolé caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide possédant un fragment continu d'au moins 200 acides aminés d'une protéine choisie parmi SEQ ID N° 2 et SEQ ID N° 5.

4. Polypeptide isolé caractérisé en ce qu'il comprend un polypeptide choisi parmi :

- a) un polypeptide correspondant à SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N° 5 ;
- 30 b) un polypeptide variant d'un polypeptide de séquence définie en a) ;
- c) un polypeptide homologue à un polypeptide défini en a) ou b), comportant au moins 80 % d'homologie avec ledit polypeptide de a) ;

- d) un fragment d'au moins 15 acides aminés consécutifs d'un polypeptide défini en a), b) ou c) ;
- e) un fragment biologiquement actif d'un polypeptide défini en a), b) ou c).

5

5. Polypeptide selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il est constitué d'une séquence choisie parmi SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 5 ou une séquence possédant au moins 80 % d'homologie avec l'une de ces séquences après alignement optimal.

10

6. Vecteur de clonage et/ou d'expression comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 ou codant pour un polypeptide selon l'une des revendications 4 et 5.

15

7. Cellule hôte caractérisée en ce qu'elle est transformée par un vecteur selon la revendication 6.

8. Animal, excepté l'homme, caractérisé en ce qu'il comprend une cellule selon la revendication 7.

20

9. Utilisation d'une séquence d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 en tant que sonde ou amorce, pour la détection et/ou l'amplification de séquences d'acide nucléique.

25

10. Utilisation *in vitro* d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 comme oligonucléotide sens ou antisens.

11. Utilisation d'une séquence d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 pour la production d'un polypeptide recombinant.

30

12. Procédé d'obtention d'un polypeptide recombinant caractérisé en ce que l'on cultive une cellule selon la revendication 7 dans des conditions permettant l'expression dudit polypeptide et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant.



13. Polypeptide recombinant caractérisé en ce qu'il est obtenu par un procédé selon la revendication 12.

5           14. Anticorps monoclonal ou polyclonal caractérisé en ce qu'il lie sélectivement un polypeptide selon l'une des revendications 4, 5 ou 13.

15. Procédé de détection d'un polypeptide selon l'une des revendications 4, 5 ou 13, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 10           a) mise en contact d'un échantillon biologique avec un anticorps selon la revendication 14 ;  
             b) mise en évidence du complexe antigène-anticorps formé.

15           16. Trousse de réactifs pour la mise en œuvre d'un procédé selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- a) un anticorps monoclonal ou polyclonal selon la revendication 14 ;  
             b) éventuellement des réactifs pour la constitution d'un milieu propice à la réaction immunologique ;  
20           c) les réactifs permettant la détection du complexe antigène-anticorps produit lors de la réaction immunologique.

25           17. Méthode de diagnostic et/ou d'évaluation pronostique d'une maladie inflammatoire et/ou immune ou d'un cancer caractérisée en ce qu'on détermine à partir d'un prélèvement biologique d'un patient la présence d'au moins une mutation et/ou une altération d'expression du gène correspondant à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4 ou SEQ ID N° 6 par l'analyse de tout ou partie d'une séquence nucléique correspondant audit gène.

30           18. Puce à ADN caractérisée en ce qu'elle contient une séquence nucléique selon l'une des revendications 1 à 3.

19. Puce à protéines caractérisée en ce qu'elle contient un polypeptide selon l'une des revendications 4, 5 ou 13, ou un anticorps selon la revendication 14.

20. Procédé de détection et/ou de dosage d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact d'un polynucléotide selon l'une des revendications 1 à 3, marqué ;
- b) détection et/ou dosage de l'hybride formé entre ledit polynucléotide et l'acide nucléique de l'échantillon biologique.

21. Procédé de détection et/ou de dosage d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend une étape d'amplification des acides nucléiques dudit échantillon biologique à l'aide d'amorces choisies parmi les acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 2.

22. Procédé de criblage de composés capables de se fixer à un polypeptide de séquence SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N° 5, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de mise en contact d'un polypeptide selon l'une des revendications 4, 5 ou 13, d'une cellule selon la revendication 7, ou d'un mammifère selon la revendication 8, avec un composé candidat et de détection de la formation d'un complexe entre ledit composé candidat et ledit polypeptide.

23. Procédé de criblage de composés capables d'interagir *in vitro* ou *in vivo* avec un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de mise en contact d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3, d'une cellule selon la revendication 7, ou d'un mammifère selon la revendication 8, avec un composé candidat et de détection de la formation d'un complexe entre ledit composé candidat et ledit acide nucléique

24. Composé caractérisé en ce qu'il est choisi parmi

- a) un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 ;

- b) un polypeptide selon l'une des revendications 4, 5 ou 13 ;
- c) un vecteur selon la revendication 6 ;
- d) une cellule selon la revendication 7 ; et
- e) un anticorps selon la revendication 14 ;

5           à titre de médicament.

25. Composé selon la revendication 24, pour la prévention et/ou le traitement d'une maladie inflammatoire et/ou immune ou d'un cancer associé à la présence d'au moins une mutation du gène correspondant à SEQ ID N° 1 ou SEQ

10   ID N° 4.

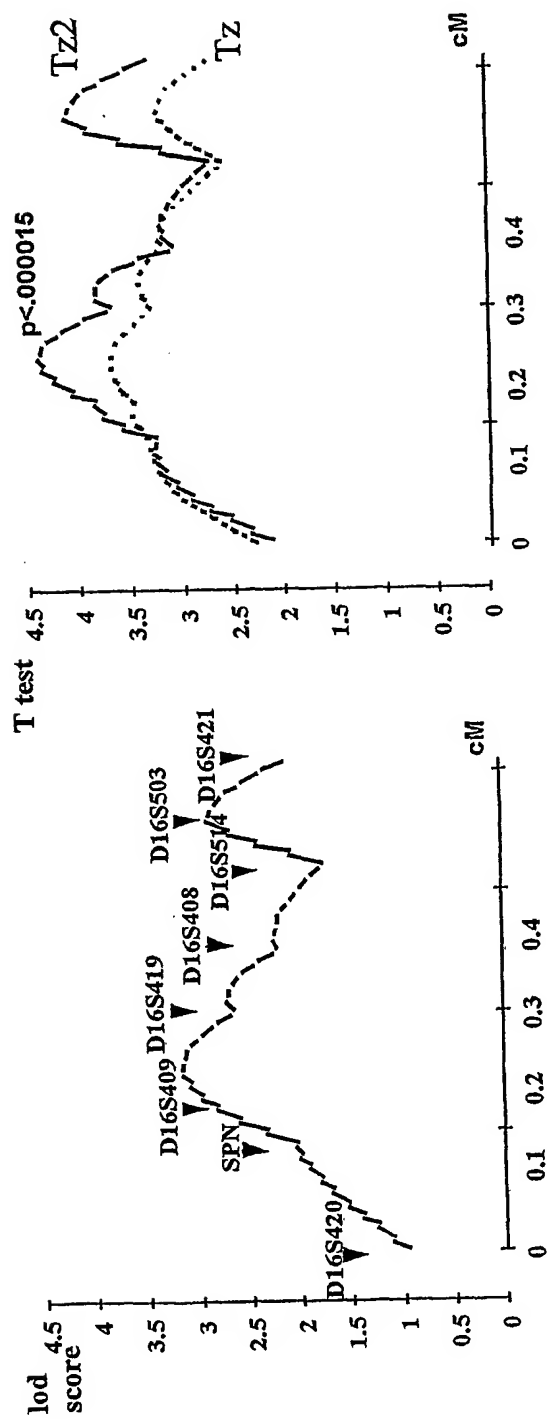


FIG.1

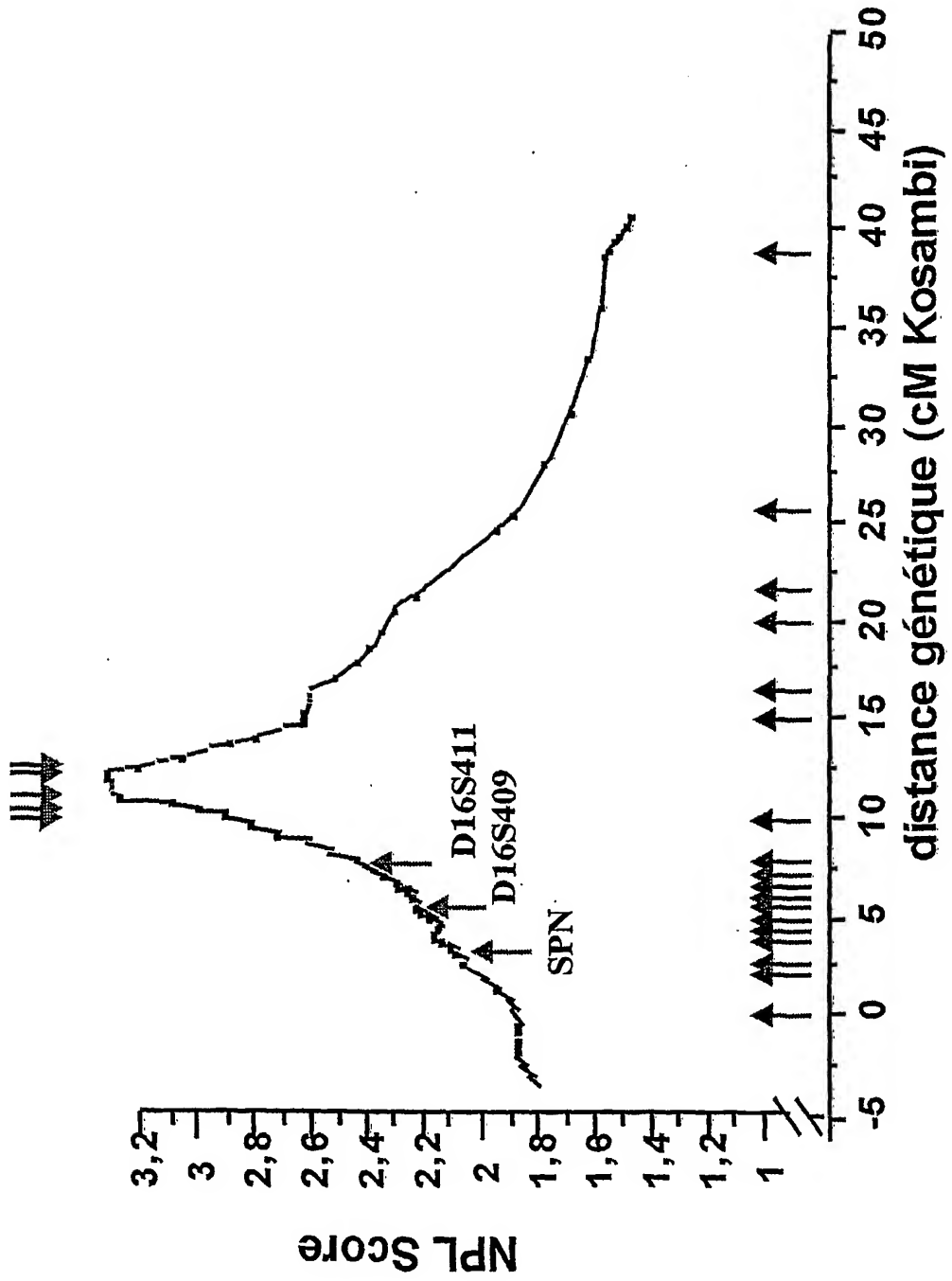


FIG.2

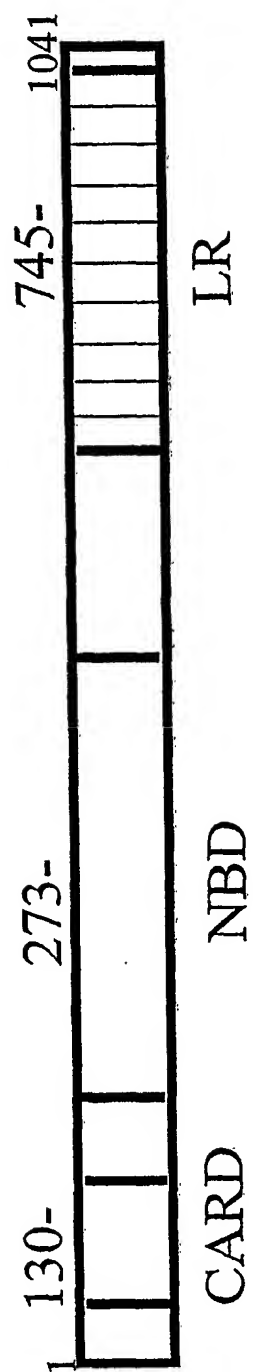


FIG.3

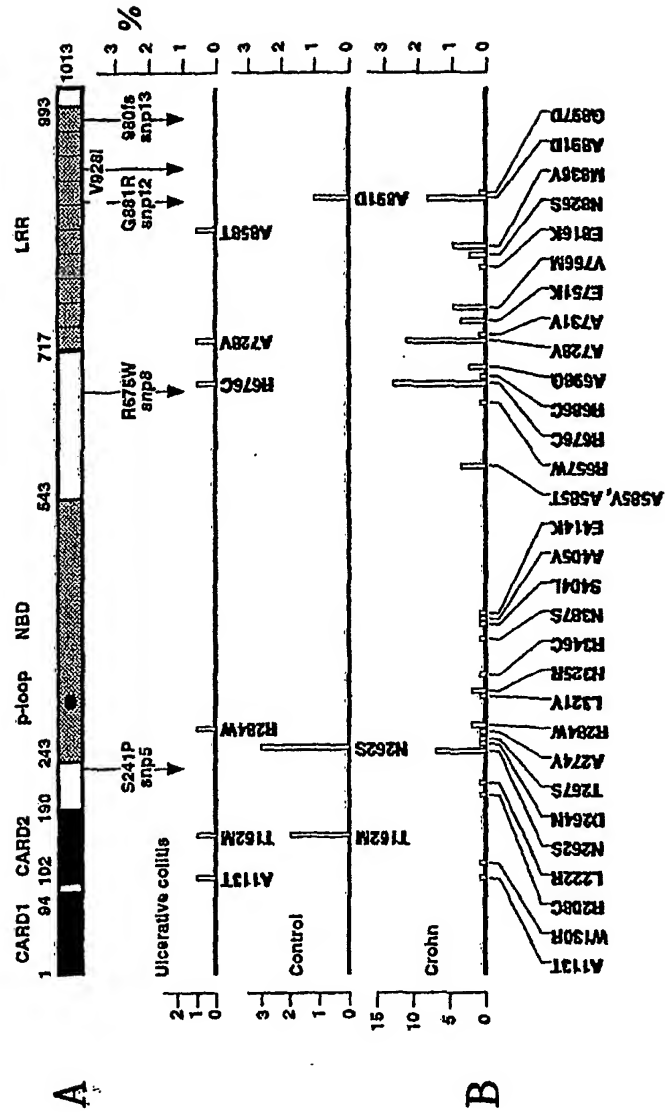


FIG. 4

## LISTE DE SÉQUENCES

&lt;110&gt; Fondation Jean Dausset - CEPH

&lt;120&gt; Gènes impliqués dans les maladies inflammatoires de l'intestin et leur utilisation

&lt;130&gt; D18702

&lt;160&gt; 90

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 4322

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(3123)

&lt;400&gt; 1

```

atg gag aag aga agg ggt cta acc att gag tgc tgg ggc ccc caa agt   48
Met Glu Lys Arg Arg Gly Leu Thr Ile Glu Cys Trp Gly Pro Gln Ser
  1             5             10             15

ccc tca ctg acc ttg ttc tcc tcc cca ggt tgt gaa atg tgc tcg cag   96
Pro Ser Leu Thr Leu Phe Ser Ser Pro Gly Cys Glu Met Cys Ser Gln
          20             25             30

gag gct ttt cag gca cag agg agc cag ctg gtc gag ctg ctg gtc tca  144
Glu Ala Phe Gln Ala Gln Arg Ser Gln Leu Val Glu Leu Leu Val Ser
      35             40             45

ggg tcc ctg gaa ggc ttc gag agt gtc ctg gac tgg ctg ctg tcc tgg  192
Gly Ser Leu Glu Gly Phe Glu Ser Val Leu Asp Trp Leu Leu Ser Trp
      50             55             60

gag gtc ctc tcc tgg gag gac tac gag ggc ttc cac ctc ctg ggc cag  240
Glu Val Leu Ser Trp Glu Asp Tyr Glu Gly Phe His Leu Leu Gly Gln
      65             70             75             80

cct ctc tcc cac ttg gcc agg cgc ctt ctg gac acc gtc tgg aat aag  288
Pro Leu Ser His Leu Ala Arg Arg Leu Leu Asp Thr Val Trp Asn Lys
          85             90             95

ggg act tgg gcc tgt cag aag ctc atc gcg gct gcc caa gaa gcc cag  336
Gly Thr Trp Ala Cys Gln Lys Leu Ile Ala Ala Ala Gln Glu Ala Gln
      100             105             110

gcc gac agc cag tcc ccc aag ctg cat ggc tgc tgg gac ccc cac tcg  384
Ala Asp Ser Gln Ser Pro Lys Leu His Gly Cys Trp Asp Pro His Ser
      115             120             125

ctc cac cca gcc cga gac ctg cag agt cac cgg cca gcc att gtc agg  432
Leu His Pro Ala Arg Asp Leu Gln Ser His Arg Pro Ala Ile Val Arg
      130             135             140

agg ctc cac agc cat gtg gag aac atg ctg gac ctg gca tgg gag cgg  480
Arg Leu His Ser His Val Glu Asn Met Leu Asp Leu Ala Trp Glu Arg

```



145	150	155	160	
ggt ttc gtc agc cag tat gaa tgt gat gaa atc agg ttg ccg atc ttc Gly Phe Val Ser Gln Tyr Glu Cys Asp Glu Ile Arg Leu Pro Ile Phe 165 170 175				528
aca ccg tcc cag agg gca aga agg ctg ctt gat ctt gcc acg gtg aaa Thr Pro Ser Gln Arg Ala Arg Arg Leu Leu Asp Leu Ala Thr Val Lys 180 185 190				576
gcg aat gga ttg gct gcc ttc ctt cta caa cat gtt cag gaa tta cca Ala Asn Gly Leu Ala Ala Phe Leu Leu Gln His Val Gln Glu Leu Pro 195 200 205				624
gtc cca ttg gcc ctg cct ttg gaa gct gcc aca tgc aag aag tat atg Val Pro Leu Ala Leu Pro Leu Glu Ala Ala Thr Cys Lys Lys Tyr Met 210 215 220				672
gcc aag ctg agg acc acg gtg tct gct cag tct cgc ttc ctc agt acc Ala Lys Leu Arg Thr Thr Val Ser Ala Gln Ser Arg Phe Leu Ser Thr 225 230 235 240				720
tat gat gga gca gag acg ctc tgc ctg gag gac ata tac aca gag aat Tyr Asp Gly Ala Glu Thr Leu Cys Leu Glu Asp Ile Tyr Thr Glu Asn 245 250 255				768
gtc ctg gag gtc tgg gca gat gtg ggc atg gct gga tcc ccg cag aag Val Leu Glu Val Trp Ala Asp Val Gly Met Ala Gly Ser Pro Gln Lys 260 265 270				816
agc cca gcc acc ctg ggc ctg gag gag ctc ttc agc acc cct ggc cac Ser Pro Ala Thr Leu Gly Leu Glu Glu Leu Phe Ser Thr Pro Gly His 275 280 285				864
ctc aat gac gat gcg gac act gtg ctg gtg gtg ggt gag gcg ggc agt Leu Asn Asp Asp Ala Asp Thr Val Leu Val Val Gly Glu Ala Gly Ser 290 295 300				912
ggc aag agc acg ctc ctg cag cgg ctg cac ttg ctg tgg gct gca ggg Gly Lys Ser Thr Leu Leu Gln Arg Leu His Leu Leu Trp Ala Ala Gly 305 310 315 320				960
caa gac ttc cag gaa ttt ctc ttt gtc ttc cca ttc agc tgc cgg cag Gln Asp Phe Gln Glu Phe Leu Phe Val Phe Pro Phe Ser Cys Arg Gln 325 330 335				1008
ctg cag tgc atg gcc aaa cca ctc tct gtg cgg act cta ctc ttt gag Leu Gln Cys Met Ala Lys Pro Leu Ser Val Arg Thr Leu Leu Phe Glu 340 345 350				1056
cac tgc tgt tgg cct gat gtt ggt caa gaa gac atc ttc cag tta ctc His Cys Cys Trp Pro Asp Val Gly Gln Glu Asp Ile Phe Gln Leu Leu 355 360 365				1104
ctt gac cac cct gac cgt gtc ctg tta acc ttt gat ggc ttt gac gag Leu Asp His Pro Asp Arg Val Leu Leu Thr Phe Asp Gly Phe Asp Glu 370 375 380				1152
ttc aag ttc agg ttc acg gat cgt gaa cgc cac tgc tcc ccg acc gac Phe Lys Phe Arg Phe Thr Asp Arg Glu Arg His Cys Ser Pro Thr Asp 385 390 395 400				1200

ccc acc tct gtc cag acc ctg ctc ttc aac ctt ctg cag ggc aac ctg	1248
Pro Thr Ser Val Gln Thr Leu Leu Phe Asn Leu Leu Gln Gly Asn Leu	
405 410 415	
ctg aag aat gcc cgc aag gtg gtg acc agc cgt ccg gcc gct gtg tcg	1296
Leu Lys Asn Ala Arg Lys Val Val Thr Ser Arg Pro Ala Ala Val Ser	
420 425 430	
gcg ttc ctc agg aag tac atc cgc acc gag ttc aac ctc aag ggc ttc	1344
Ala Phe Leu Arg Lys Tyr Ile Arg Thr Glu Phe Asn Leu Lys Gly Phe	
435 440 445	
tct gaa cag ggc atc gag ctg tac ctg agg aag cgt cat cat gag ccc	1392
Ser Glu Gln Gly Ile Glu Leu Tyr Leu Arg Lys Arg His His Glu Pro	
450 455 460	
ggg gtg gcg gac cgc ctc atc cgc ctg ctc caa gag acc tca gcc ctg	1440
Gly Val Ala Asp Arg Leu Ile Arg Leu Leu Gln Glu Thr Ser Ala Leu	
465 470 475 480	
cac ggt ttg tgc cac ctg cct gtc ttc tca tgg atg gtg tcc aaa tgc	1488
His Gly Leu Cys His Leu Pro Val Phe Ser Trp Met Val Ser Lys Cys	
485 490 495	
cac cag gaa ctg ttg ctg cag gag ggg ggg tcc cca aag acc act aca	1536
His Gln Glu Leu Leu Leu Gln Glu Gly Gly Ser Pro Lys Thr Thr Thr	
500 505 510	
gat atg tac ctg ctg att ctg cag cat ttt ctg ctg cat gcc acc ccc	1584
Asp Met Tyr Leu Leu Ile Leu Gln His Phe Leu Leu His Ala Thr Pro	
515 520 525	
cca gac tca gct tcc caa ggt ctg gga ccc agt ctt ctt cgg ggc cgc	1632
Pro Asp Ser Ala Ser Gln Gly Leu Gly Pro Ser Leu Leu Arg Gly Arg	
530 535 540	
ctc ccc acc ctc ctg cac ctg ggc aga ctg gct ctg tgg ggc ctg ggc	1680
Leu Pro Thr Leu Leu His Leu Gly Arg Leu Ala Leu Trp Gly Leu Gly	
545 550 555 560	
atg tgc tgc tac gtg ttc tca gcc cag cag ctc cag gca gca cag gtc	1728
Met Cys Cys Tyr Val Phe Ser Ala Gln Gln Leu Gln Ala Ala Gln Val	
565 570 575	
agc cct gat gac att tct ctt ggc ttc ctg gtg cgt gcc aaa ggt gtc	1776
Ser Pro Asp Asp Ile Ser Leu Gly Phe Leu Val Arg Ala Lys Gly Val	
580 585 590	
gtg cca ggg agt acg gcg ccc ctg gaa ttc ctt cac atc act ttc cag	1824
Val Pro Gly Ser Thr Ala Pro Leu Glu Phe Leu His Ile Thr Phe Gln	
595 600 605	
tgc ttc ttt gcc gcg ttc tac ctg gca ctc agt gct gat gtg cca cca	1872
Cys Phe Phe Ala Ala Phe Tyr Leu Ala Leu Ser Ala Asp Val Pro Pro	
610 615 620	
gct ttg ctc aga cac ctc ttc aat tgt ggc agg cca ggc aac tca cca	1920
Ala Leu Leu Arg His Leu Phe Asn Cys Gly Arg Pro Gly Asn Ser Pro	
625 630 635 640	

atg gcc agg ctc ctg ccc acg atg tgc atc cag gcc tcg gag gga aag	1968
Met Ala Arg Leu Leu Pro Thr Met Cys Ile Gln Ala Ser Glu Gly Lys	
645 650 655	
gac agc agc gtg gca gct ttg ctg cag aag gcc gag ccg cac aac ctt	2016
Asp Ser Ser Val Ala Ala Leu Leu Gln Lys Ala Glu Pro His Asn Leu	
660 665 670	
cag atc aca gca gcc ttc ctg gca ggg ctg ttg tcc cgg gag cac tgg	2064
Gln Ile Thr Ala Ala Phe Leu Ala Gly Leu Leu Ser Arg Glu His Trp	
675 680 685	
ggc ctg ctg gct gag tgc cag aca tct gag aag gcc ctg ctc cgg cgc	2112
Gly Leu Leu Ala Glu Cys Gln Thr Ser Glu Lys Ala Leu Leu Arg Arg	
690 695 700	
cag gcc tgt gcc cgc tgg tgt ctg gcc cgc agc ctc cgc aag cac ttc	2160
Gln Ala Cys Ala Arg Trp Cys Leu Ala Arg Ser Leu Arg Lys His Phe	
705 710 715 720	
cac tcc atc ccg cca gct gca ccg ggt gag gcc aag agc gtg cat gcc	2208
His Ser Ile Pro Pro Ala Ala Pro Gly Glu Ala Lys Ser Val His Ala	
725 730 735	
atg ccc ggg ttc atc tgg ctc atc cgg agc ctg tac gag atg cag gag	2256
Met Pro Gly Phe Ile Trp Leu Ile Arg Ser Leu Tyr Glu Met Gln Glu	
740 745 750	
gag cgg ctg gct cgg aag gct gca cgt ggc ctg aat gtt ggg cac ctc	2304
Glu Arg Leu Ala Arg Lys Ala Ala Arg Gly Leu Asn Val Gly His Leu	
755 760 765	
aag ttg aca ttt tgc agt gtg ggc ccc act gag tgt gct gcc ctg gcc	2352
Lys Leu Thr Phe Cys Ser Val Gly Pro Thr Glu Cys Ala Ala Leu Ala	
770 775 780	
ttt gtg ctg cag cac ctt cgg cgg ccc gtg gcc ctg cag ctg gac tac	2400
Phe Val Leu Gln His Leu Arg Arg Pro Val Ala Leu Gln Leu Asp Tyr	
785 790 795 800	
aac tct gtg ggt gac att ggc gtg gag cag ctg ctg cct tgc ctt ggt	2448
Asn Ser Val Gly Asp Ile Gly Val Glu Gln Leu Leu Pro Cys Leu Gly	
805 810 815	
gtc tgc aag gct ctg tat ttg cgc gat aac aat atc tca gac cga ggc	2496
Val Cys Lys Ala Leu Tyr Leu Arg Asp Asn Asn Ile Ser Asp Arg Gly	
820 825 830	
atc tgc aag ctc att gaa tgt gct ctt cac tgc gag caa ttg cag aag	2544
Ile Cys Lys Leu Ile Glu Cys Ala Leu His Cys Glu Gln Leu Gln Lys	
835 840 845	
tta gct cta ttc aac aac aaa ttg act gac ggc tgt gca cac tcc atg	2592
Leu Ala Leu Phe Asn Asn Lys Leu Thr Asp Gly Cys Ala His Ser Met	
850 855 860	
gct aag ctc ctt gca tgc agg cag aac ttc ttg gca ttg agg ctg ggg	2640
Ala Lys Leu Leu Ala Cys Arg Gln Asn Phe Leu Ala Leu Arg Leu Gly	
865 870 875 880	
aat aac tac atc act gcc gcg gga gcc caa gtg ctg gcc gag ggg ctc	2688

Asn Asn Tyr Ile Thr Ala Ala Gly Ala Gln Val Leu Ala Glu Gly Leu  
 885 890 895  
 cga ggc aac acc tcc ttg cag ttc ctg gga ttc tgg ggc aac aga gtg 2736  
 Arg Gly Asn Thr Ser Leu Gln Phe Leu Gly Phe Trp Gly Asn Arg Val  
 900 905 910  
 ggt gac gag ggg gcc cag gcc ctg gct gaa gcc ttg ggt gat cac cag 2784  
 Gly Asp Glu Gly Ala Gln Ala Leu Ala Glu Ala Leu Gly Asp His Gln  
 915 920 925  
 agc ttg agg tgg ctc agc ctg gtg ggg aac aac att ggc agt gtg ggt 2832  
 Ser Leu Arg Trp Leu Ser Leu Val Gly Asn Asn Ile Gly Ser Val Gly  
 930 935 940  
 gcc caa gcc ttg gca ctg atg ctg gca aag aac gtc atg cta gaa gaa 2880  
 Ala Gln Ala Leu Ala Leu Met Leu Ala Lys Asn Val Met Leu Glu Glu  
 945 950 955 960  
 ctc tgc ctg gag gag aac cat ctc cag gat gaa ggt gta tgt tct ctc 2928  
 Leu Cys Leu Glu Glu Asn His Leu Gln Asp Glu Gly Val Cys Ser Leu  
 965 970 975  
 gca gaa gga ctg aag aaa aat tca agt ttg aaa atc ctg aag ttg tcc 2976  
 Ala Glu Gly Leu Lys Lys Asn Ser Ser Leu Lys Ile Leu Lys Leu Ser  
 980 985 990  
 aat aac tgc atc acc tac cta ggg gca gaa gcc ctc ctg cag gcc ctt 3024  
 Asn Asn Cys Ile Thr Tyr Leu Gly Ala Glu Ala Leu Leu Gln Ala Leu  
 995 1000 1005  
 gaa agg aat gac acc atc ctg gaa gtc tgg ctc cga ggg aac act ttc 3072  
 Glu Arg Asn Asp Thr Ile Leu Glu Val Trp Leu Arg Gly Asn Thr Phe  
 1010 1015 1020  
 tct cta gag gag gtt gac aag ctc ggc tgc agg gac acc aga ctc ttg 3120  
 Ser Leu Glu Glu Val Asp Lys Leu Gly Cys Arg Asp Thr Arg Leu Leu  
 1025 1030 1035 1040  
 ctt tgaagtctcc gggaggatgt tcgtctcagt ttgtttgtga caggctgtga 3173  
 Leu  
 gtttgggccc cagaggctgg gtgacatgtg ttggcagcct cttcaaaatg agccctgtcc 3233  
 tgcctaaggc tgaacttggt ttctgggaac accataggtc acctttattc tggcagagga 3293  
 gggagcatca gtgccctcca ggatagactt ttcccaagcc tacttttgcc attgacttct 3353  
 tcccaagatt caatcccagg atgtacaagg acagccccc tccatagtat gggactggcc 3413  
 tctgctgac ctcacagget tccgtgtggg tcagtggggc ccatggatgt gcttgtaaac 3473  
 tgagtgcctt ttggtggaga ggcccggccc acataattca ggaagcagct ttcccatgt 3533  
 ctcgactcat ccatccaggc cattcccgt ctctggttcc tcccctctc ctggactcct 3593  
 gcacacgctc cttcctctga ggtgaaatt cagaatatta gtgacctcag ctttgatatt 3653  
 tcacttacag ccccccaac cctggcacc aggggtggaa gggctacacc ttagcctgcc 3713  
 ctcctttcog gtgtttaaga cttttttgga aggggacag tgacagccgt ttgttcccca 3773

agacattcta ggtttgcaag aaaaatata ccaactcca gctgggatca catgtggact 3833  
 tttatttcca gtgaaatcag ttactcttca gttaagcctt tggaacagc tcgactttaa 3893  
 aaagctccaa atgcagcttt aaaaaattaa tctgggccag aatttcaaac ggcctcacta 3953  
 ggcttctggt tgatgcctgt gaactgaact ctgacaacag acttctgaaa tagaccaca 4013  
 agaggcagtt ccatttcatt tgtgccagaa tgctttagga tgtacagtta tggattgaaa 4073  
 gtttacagga aaaaaatta ggccgttcct tcaaagcaaa tgtcttcctg gattattcaa 4133  
 aatgatgtat gttgaagcct ttgtaaattg tcagatgctg tgcaaatggt attattttaa 4193  
 acattatgat gtgtgaaaac tggtaatat ttatagggtca ctttgtttta ctgtcttaag 4253  
 tttatactct tatagacaac atggccgtga actttatgct gtaaataatc agaggggaat 4313  
 aaactgttg 4322

<210> 2

<211> 1041

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Glu	Lys	Arg	Arg	Gly	Leu	Thr	Ile	Glu	Cys	Trp	Gly	Pro	Gln	Ser	1	5	10	15
Pro	Ser	Leu	Thr	Leu	Phe	Ser	Ser	Pro	Gly	Cys	Glu	Met	Cys	Ser	Gln	20	25	30	
Glu	Ala	Phe	Gln	Ala	Gln	Arg	Ser	Gln	Leu	Val	Glu	Leu	Leu	Val	Ser	35	40	45	
Gly	Ser	Leu	Glu	Gly	Phe	Glu	Ser	Val	Leu	Asp	Trp	Leu	Leu	Ser	Trp	50	55	60	
Glu	Val	Leu	Ser	Trp	Glu	Asp	Tyr	Glu	Gly	Phe	His	Leu	Leu	Gly	Gln	65	70	75	80
Pro	Leu	Ser	His	Leu	Ala	Arg	Arg	Leu	Leu	Asp	Thr	Val	Trp	Asn	Lys	85	90	95	
Gly	Thr	Trp	Ala	Cys	Gln	Lys	Leu	Ile	Ala	Ala	Ala	Gln	Glu	Ala	Gln	100	105	110	
Ala	Asp	Ser	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	His	Gly	Cys	Trp	Asp	Pro	His	Ser	115	120	125	
Leu	His	Pro	Ala	Arg	Asp	Leu	Gln	Ser	His	Arg	Pro	Ala	Ile	Val	Arg	130	135	140	
Arg	Leu	His	Ser	His	Val	Glu	Asn	Met	Leu	Asp	Leu	Ala	Trp	Glu	Arg	145	150	155	160
Gly	Phe	Val	Ser	Gln	Tyr	Glu	Cys	Asp	Glu	Ile	Arg	Leu	Pro	Ile	Phé	165	170	175	

Thr Pro Ser Gln Arg Ala Arg Arg Leu Leu Asp Leu Ala Thr Val Lys  
 180 185 190  
 Ala Asn Gly Leu Ala Ala Phe Leu Leu Gln His Val Gln Glu Leu Pro  
 195 200 205  
 Val Pro Leu Ala Leu Pro Leu Glu Ala Ala Thr Cys Lys Lys Tyr Met  
 210 215 220  
 Ala Lys Leu Arg Thr Thr Val Ser Ala Gln Ser Arg Phe Leu Ser Thr  
 225 230 235 240  
 Tyr Asp Gly Ala Glu Thr Leu Cys Leu Glu Asp Ile Tyr Thr Glu Asn  
 245 250 255  
 Val Leu Glu Val Trp Ala Asp Val Gly Met Ala Gly Ser Pro Gln Lys  
 260 265 270  
 Ser Pro Ala Thr Leu Gly Leu Glu Glu Leu Phe Ser Thr Pro Gly His  
 275 280 285  
 Leu Asn Asp Asp Ala Asp Thr Val Leu Val Val Gly Glu Ala Gly Ser  
 290 295 300  
 Gly Lys Ser Thr Leu Leu Gln Arg Leu His Leu Leu Trp Ala Ala Gly  
 305 310 315 320  
 Gln Asp Phe Gln Glu Phe Leu Phe Val Phe Pro Phe Ser Cys Arg Gln  
 325 330 335  
 Leu Gln Cys Met Ala Lys Pro Leu Ser Val Arg Thr Leu Leu Phe Glu  
 340 345 350  
 His Cys Cys Trp Pro Asp Val Gly Gln Glu Asp Ile Phe Gln Leu Leu  
 355 360 365  
 Leu Asp His Pro Asp Arg Val Leu Leu Thr Phe Asp Gly Phe Asp Glu  
 370 375 380  
 Phe Lys Phe Arg Phe Thr Asp Arg Glu Arg His Cys Ser Pro Thr Asp  
 385 390 395 400  
 Pro Thr Ser Val Gln Thr Leu Leu Phe Asn Leu Leu Gln Gly Asn Leu  
 405 410 415  
 Leu Lys Asn Ala Arg Lys Val Val Thr Ser Arg Pro Ala Ala Val Ser  
 420 425 430  
 Ala Phe Leu Arg Lys Tyr Ile Arg Thr Glu Phe Asn Leu Lys Gly Phe  
 435 440 445  
 Ser Glu Gln Gly Ile Glu Leu Tyr Leu Arg Lys Arg His His Glu Pro  
 450 455 460  
 Gly Val Ala Asp Arg Leu Ile Arg Leu Leu Gln Glu Thr Ser Ala Leu  
 465 470 475 480  
 His Gly Leu Cys His Leu Pro Val Phe Ser Trp Met Val Ser Lys Cys  
 485 490 495  
 His Gln Glu Leu Leu Leu Gln Glu Gly Gly Ser Pro Lys Thr Thr Thr

500

505

510

8

Ile Cys Lys Leu Ile Glu Cys Ala Leu His Cys Glu Gln Leu Gln Lys  
           835                          840                          845  
 Leu Ala Leu Phe Asn Asn Lys Leu Thr Asp Gly Cys Ala His Ser Met  
           850                          855                          860  
 Ala Lys Leu Leu Ala Cys Arg Gln Asn Phe Leu Ala Leu Arg Leu Gly  
           865                          870                          875                          880  
 Asn Asn Tyr Ile Thr Ala Ala Gly Ala Gln Val Leu Ala Glu Gly Leu  
                           885                          890                          895  
 Arg Gly Asn Thr Ser Leu Gln Phe Leu Gly Phe Trp Gly Asn Arg Val  
                           900                          905                          910  
 Gly Asp Glu Gly Ala Gln Ala Leu Ala Glu Ala Leu Gly Asp His Gln  
                           915                          920                          925  
 Ser Leu Arg Trp Leu Ser Leu Val Gly Asn Asn Ile Gly Ser Val Gly  
           930                          935                          940  
 Ala Gln Ala Leu Ala Leu Met Leu Ala Lys Asn Val Met Leu Glu Glu  
           945                          950                          955                          960  
 Leu Cys Leu Glu Glu Asn His Leu Gln Asp Glu Gly Val Cys Ser Leu  
                           965                          970                          975  
 Ala Glu Gly Leu Lys Lys Asn Ser Ser Leu Lys Ile Leu Lys Leu Ser  
                           980                          985                          990  
 Asn Asn Cys Ile Thr Tyr Leu Gly Ala Glu Ala Leu Leu Gln Ala Leu  
           995                          1000                          1005  
 Glu Arg Asn Asp Thr Ile Leu Glu Val Trp Leu Arg Gly Asn Thr Phe  
           1010                          1015                          1020  
 Ser Leu Glu Glu Val Asp Lys Leu Gly Cys Arg Asp Thr Arg Leu Leu  
           1025                          1030                          1035                          1040  
 Leu

<210> 3  
 <211> 37443  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> exon  
 <222> (63)..(106)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (3908)..(4406)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (12307)..(12412)



<220>  
 <221> exon  
 <222> (15010)..(16825)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (21017)..(21100)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (21321)..(21404)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (24355)..(24438)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (27052)..(27135)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (27730)..(27813)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (29917)..(30000)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (34244)..(34327)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (36123)..(37443)

<400> 3  
 tcacccatata actggtatatt aaagccacaa gagcaggtgg gctcatctag ggatggagtg 60  
 atatggagaa gagaaggggt ctaaccattg agtgctgggg cccccagtg taggaaccag 120  
 ccaagaagac agaaagagtg aaaatcagag agttgggggtg tcctggagga aatgaagaaa 180  
 atgccccaaa gaggaaggag ggaacaaata tgaccaatgc ccctggcaga gcaagcaggc 240  
 tgagggctga ggattgagca atgggaggtc actggtgaca gtttcaactg agctggatgg 300  
 ggaactagag ggaatgggag gggatgggag gacttgggga cagcagtaca ggcaacagac 360  
 aagggggcct gctgtaaagg gagcagataa atgggattgg agccaaatga agaaggggag 420  
 tgtcaagaga gtgctttact tttaaatgg agaattagag tgcatgtgc actggtgggg 480  
 ggatttgatc tcttagggag agaacagtg tagggaggga gaatgcagga tagctggggg 540  
 aggggtgggg gcttggcccc agcagagact caggacactt gggaagttga gcttccctgg 600  
 gcttcccctc ctctcctgtc tgcaaggggt cagtgggctg agatttcagc acttaagcaa 660  
 agcatttgct cttggcccc gagaaaccgg gctggctgtg gtctcaggaa ggaaggaggt 720  
 gtccaggctc aggcctgggc ctgggtttca gggaggggcc acgtgggtca ccccttgacc 780  
 ctctctttca gcaagggaagt gatcctttct ctacatgggc ctcaccttgg ggaggacaa 840  
 ggtgtctttg aagttgtagt aactgaagta gagatcaaaa ggcaatgcag atagactgac 900  
 agatttcgcc tgaagagggg aagcccgacc aggtataaaa ggagtaagag gaaggatgtt 960  
 aaggacaatt ttaggaaaca gataatgagt gaatatTTTT tctctctctt tcccaattta 1020  
 aactgaagca ggagaaactg aagctagaca taatgattaa cttcccaagc tggtagctt 1080  
 cctgagctgg ttagtgagaa cagcactaag gccaggttct cctccccaga tgtttaagat 1140  
 gagacaggac aatgcctgct cagagacagg gcctggctga attggccctc aggattctct 1200  
 ctgctctgag gtttctggaa gaaggccagg gcagaggtgt ggtgatgtag ctgctgggag 1260  
 gacagagctc cgagtcacgt ggcttgggcg ggccctccct tcctggtgtc cacagaagcc 1320  
 caacgtcact agctgggggtg tgtatggctc acacgtaggc caggctgccc taggcttggg 1380

gtgcaaggga gggggccccta cttacttgtg gacctgtccc tcgtgaatgt gtctcatgtc 1440  
 cccagtgggg tttttcagtg aggggtcatgg tctccaggat gcacaaggct ttgtgccaga 1500  
 attgtcttga attgcctagt tctggaaggc tgggtggcca actctggcct ccggcttttc 1560  
 ctttgggaat ttcccttgaa ggtgggggtg gtagacagat ccaggtcac cagtctgtg 1620  
 ccactgggct tttggcattc tgcacaaggc ctaccgcag atgccatgcc tgcctcccca 1680  
 gcctaattgg ctttgatggg ggaagagggt ggttcagcct ctcacgatga ggaggaaaga 1740  
 gcaagtgtcc tctcgggaca ttctccgggt aagaggagca ggcattgtcc cgtcccagct 1800  
 tgatcctcag ccttctttca tccttgccg cgacatgctc ccaggcctgg ggtcagatgg 1860  
 ggagtgtga ctctgtttct gggctgtttt ctggggagaa tgggtcggcg ggttttttc 1920  
 cccaggacct gggcagggtc aatgggtggg gccgtgtcg cctcttggc tgggttttc 1980  
 acagctgaga accactccag ggccaagccc agagcttatt ctaccctttt ttgtcctctc 2040  
 ttccctgtc ctggccacc ccacctctt ggctcctctg cttagatgtg ggcacaagga 2100  
 ggagaactcc ttggcctgag agaactacct tagatcctgg cttccagtgg cctctgcagg 2160  
 ggggtacacc ctctctcca agcagccaga cacacaagta acctcattgc ctcagtttcc 2220  
 ccatctgacc agcacagggc cccctgtgcc ccagcagcgt tctgagagat tggagcttcc 2280  
 tccttttgc taccctggct accgtatgag gacggataca gagtgttccc cccaccccca 2340  
 gccaggggga tatttgatcc atgaacattc cctcagtgtc tttgtggggg acaatgctgt 2400  
 gccaggctca gggatgccag gacgagtaag acccaggctc ccacgtggcc caggcaggga 2460  
 gagagacaca taaacaacca tcaggaaaga ggtaaaatcc ccaggccact tggcatctgc 2520  
 tcctctgagt gtcctgggaat gtcctgatt tataaaaaga agctgacggc cctctttgtt 2580  
 gtccatgcct acacccttcc actttcgttt cttcggggca ctgcagcagc cttgttccc 2640  
 agaccccatg acaatcgcag aactgaccat gctgagagat tttcttggct gctcaggggc 2700  
 cctgccaggg cttgaagctc ctggagggtc acttgccctc aaattcccag aacgcacagc 2760  
 aggtcactga tgatagcagt ggcagcagtc tgtgcacggg ggtttcgagg gcgtgggagg 2820  
 gaggtgaggg ccctagggca agtggtgtgt ggaagtgtt atgggggaca aggcaccaga 2880  
 acgtcggaa acaacttagt ttgcaccgta atttttcaat tcgcctagga caggacctt 2940  
 agagcaatat tctgagtcta ccccttggag tagcagtgtg caaaacacac agcacgggct 3000  
 tggggccccc gtggggaacc caaatgtaag agttagagac atgcattccg gagtcatata 3060  
 tggctcgtgt tgaatcctg actctgcctg tctagctgtg acacatcgta caaatcactt 3120  
 agcttcttgg tgcctcagtg tcttccctctg tagaatgggt agatcatagg cactacttca 3180  
 gagtggctgg gagggttcag tgaattcctg caggagagca cttagaatgg cacttgggt 3240  
 gtagtttatg ctttaattat attagccgtt actgaaactg ctgtagcctg aatccagcca 3300  
 gcatgaaaga gccctctca cctgcttcg aagagaatga attccctgat tgtttggaag 3360  
 atctctctct ctctctctgt cttttttttt tttttttgag aaacggtctt gctctcttgc 3420  
 ccaggctgga ggcgaatggg gccatcttgg ctactgcaa cctctgcctc ccgggttcaa 3480  
 gtgattctcc tgtctcagcc tcctgagtag ctgggattac aggcgctcgc caccacgcct 3540  
 ggctaatttt tgtattttta gtagagacag cgtttcaccc tgttgcccg gctggtctag 3600  
 cgctcctgat ctcaagtga cttgggagat ctcttgcctc taatattacc tcaagcctt 3660  
 ttaaacgttt taagccggag accaagcatg gatatgggag ttagggtct tgaattaat 3720  
 cttggttgc tcaaacctct tggaaacctg aggtgtttct tgccttctct ggtctcaat 3780  
 tttcacatct atatgggtgg gagcttggat tgggtaatgt ctgaggctag aacctggcc 3840  
 aactcgggt ctgctggggc tgacttgcct tggccttccc tgaccacct gcactggct 3900  
 tctggagaag tcctcactg acctgttct cctcccagg ttgtgaaat tgcctgcagg 3960  
 aggttttca ggcacagagg agccagctgg tcgagctgct ggtctcagg tccctggaag 4020  
 gcttcgagag tgtcctggag tggctgctg cctgggagg cctctcctg gaggactacg 4080  
 agggcttcca cctcctggc cccacttctc cccacttggc caggcgcctt ctggacaccg 4140  
 tctggaataa gggtaactgg gcctgtcaga agctcatcgc ggctgccaa gaagcccagg 4200  
 ccgacagcca gtccccaag ctgcatggct gctgggaccc ccactcgct caccagccc 4260  
 gagacctgca gagtaccgg ccagccattg tcaggaggct ccacagccat gtggagaaca 4320  
 tgctggacct ggcattggag cggggtttcg tcagccagta tgaatgtgat gaaatcagg 4380  
 tgccgatctt cacaccgtcc cagagggtga ggcactcctg gtgtgcatca cagagttctc 4440  
 aggaaagggt tgcctagtca ccaagactga tttgtctca tgaagtcagc ctgtggggta 4500  
 acttgggtcc tgggatttcc cctaaaaagg tagccaggca ggtaaaatt gctcttgact 4560  
 ctggcaggga aacatacaac tctttcttct ttcttttctt ttcttttct cactctgtta 4620  
 ccctggctag aatgcagtgg cacaatcata gctcactgta gccttgaatt cctgcgctca 4680  
 agtgatcttc tggccttaga gtagctggga ctacggctgc tgaaccacca tgaacagcta 4740  
 attttttttt ttctttttag agatgggggt ttgctatgtt gccaggctg gtctccagct 4800  
 cctggcttta agcaatcctc ccgcttggc cctccaaact gttgggattg caggcatgag 4860  
 ccactttgcc tggccaacag aacacttctg ccgagaggaa gtgtgtgtg gccaggaaact 4920  
 cagattctgg agccagaatg gtgcaggctc aaggtaacc ctgtgtgat tcaggcttcc 4980  
 ctatggagcc tctccagcct cagtctccct tgtttcagtt tcctcatcta caaaacaatg 5040

ttaatagtca aatggtgcct atcctataag gctcttggga ggattcagt agttaatttg 5100  
 agtaatgctt aggatagtgt ctattaccac tggctgctat ttattatttc tgttatgagt 5160  
 gatactctgt acttgtagac ttttatttct gctgtgttta aattaacagc acaacagacc 5220  
 ataacactgc agtatattga atttatttta taattaacat agcatattat aaactaatat 5280  
 agcttaaatg tttatgtagg atttctgaca tgaattgca ttagatcata gatgttcaga 5340  
 gttggtatat aacagcccct gagaatgtag taactcagca gagaccagaa ggtcagagaa 5400  
 atgaccactg agtatttttg aaactctttt gttttcttcc aaatagtgt tcttagggct 5460  
 cctgagaggc agatggaaca atcattaaca ttccacttta taaatcggga agttgagacc 5520  
 aaggaaagta gtttgaataa gctcacagta gttaatgagg gggccagtgc tggaccaatt 5580  
 gccagcact gggtcattgac ttattcatcc atcattcatt tattcagcca gaatctatta 5640  
 gggtgcttcat acataatttg ttaaagtttg ttgtgttcat agagctttgc acacggtagg 5700  
 tactccataa acatttgttg atgaaataag tgagtacttg aatgaatgat tgaattagaa 5760  
 tgacactgca gtgttataat gggctgggtt ggggaacatt ttagtttttg tttttgtctg 5820  
 ttttccaaaa atgtatgtgt tgttcacatg agtctggata accctagatt gagattgatg 5880  
 acataaataa atttgtcttc aaggctgcac taaagctggc tcacatggct aggtatttac 5940  
 aggcagaaag tgggtcagtc ctctctgatt agttgcacgt acagaagaca tttcgttat 6000  
 tggactgacc ttagtttctc ttataatttg ttagggaat tgaatcagcc catctgagaa 6060  
 gttacaagat tgtgtcttgt catctttaa agttcagcaa tgtgatgtgg tacagatggt 6120  
 ctgaggggtt tggagaaggt agcctagatc cctagggccc agagaagaca ggatgtgaac 6180  
 agaggaagta catggattgg tgaagaaaag aaatgggata actcatgggt caaagaagaa 6240  
 atcatgatgg aaatcagaaa atattcagaa ccatacaata atgagaatat tatttatcaa 6300  
 aatctattgg atgcagctaa agcaggacat agggggaaat ttacaacctt aggtgcctag 6360  
 attaggaaag aaggaaggca tttgtttatt tatttgttta tttatttatt tgagatgggg 6420  
 gtctcactgt gtcacccagg ctgctggagt gcagtagcac gatcataaat cactgaagtc 6480  
 tcgaacttct gggctgaagt gatcctccc cctcagcctt ccaagtaggt gggacacagg 6540  
 ctgaccacac cataccaggc taattttttt tttgtagaca cagggtcttg ctatgttgag 6600  
 gtctcaaact ctgggctca agtaatctc ctccctcggc ttcccaaagt gctgggatta 6660  
 caggcatgag ccactgcgcc catctaaggc tgaattttaa tgagctaaga attcatctta 6720  
 agaaagggtc aaatagacag caaaagcaaa cattgaaggt tgggactgag ctgagtgggt 6780  
 agcagggatg ggagacaaca gatctgagga gagcaggaga ttttgaagg attgcactgc 6840  
 ctgaggttta agcctttaga atccagctct ctctgagctc cctttgagct ctgacattct 6900  
 gtgactctga tttggtggcc ttcccttagt ggccttactg atttcatttg gatgtgctt 6960  
 gtggtatatc caaccaacat gtcttcccaa atggcctttt aatttcctat aaagaagtga 7020  
 tttgcattga ttgcaggta gggacagaaa atgctgtgga atgaaacaaa atgcaagtta 7080  
 aagaactaaa ttccaaaaat acccattgct actattgact gagtgaattc ctactgtgtg 7140  
 ccagacactg taccagtcct attccctgta ttgttttatt taagcctcac aagggtatag 7200  
 tgtgactaca ctgtttctta acaatgaaga aactgcccaa atcgcccatc tgggaagcgg 7260  
 ccagctaga atttgaatcc aggcctgttt tctccagag ctgtgtctat tctctgtctg 7320  
 tcataaaatg tgggggcttt gtgtggtaaa ctgtctcagt tgggcatagc agttgttagg 7380  
 aaacctgagg ctggtaacac cagctgtaat accagctgtc cgtctgactc atgcaactgt 7440  
 taaagtgtat agggctgagg tgtcagactg agctctgaat tgctgattc ctataacaat 7500  
 attaaactaa acatttttta aattgggaaa tgcacatgc atacagaaga gtgtgtatat 7560  
 ttcatatgta tagtgtaaac tgttcccatc acccaggtta aaaaacagga tgttgccagt 7620  
 acctggggcc ttctttaact gcaactgcta gaggtaaaca ctggcttgac ttttgtgtaa 7680  
 atcatctctt tgcccttctt taatgtttta gcatctttta aaataaatcc ccaaataatg 7740  
 tattgttcta ttttgaaaaa ctgagtagca agccaaaaat agctgtgtaa agaaaggta 7800  
 cttaaattag gtggtgtgca gtggctcaag cctttaatcc cagtactttg ggaggctgag 7860  
 gcagggtgat cacaaggtca ggagatcgag accatcctgg ccaacatgga gaaacccgt 7920  
 ctctactaaa aatacaaaaa attagccaag aatagtggca tgtgcctgta gtcccagcta 7980  
 ctcgggaggc tgaggcagga gaatcgcttg aacccgggag gcagatgttg cagtgaactg 8040  
 agatcgact gcttgaacc' gggaggcaga ggttgcatg agccaagatc gcaccactgc 8100  
 actctagcct ggttcacaga gcaagactct gtctcaaaaa aaaaaaaag 8160  
 gttactattg ccttttctta gatgaagggt ccaaggcag ggaagctaa gtggagtctc 8220  
 agggacttgg tctggctttt ccttccctgg gaatttataa ggacctcttc tgggaagtca 8280  
 gtcggcaatg ccatgaatga gtctggggaa atattgggct cattgcaact ggagggtctg 8340  
 gtaggactga tgtgaattag gtgctgtgtc cggaggaaaa tggccagagg aagtgggctg 8400  
 ctttgtacag tcagtggtaa agttgccaaa ggctattata gctcacagga atgggccaag 8460  
 gtaaaacact cctgtggagt gaaatgaatg tctcagctg actgaggcag cgggagtga 8520  
 gaagaaacga ttttagttca tgggtgaagac aagtcaata tagataaagg ttagggtcag 8580  
 gcttgctgg acatctagga gataactgcc ctcaacttgt ttgaatcttg agtactgct 8640  
 ccattttgtt tgaactggtg gccatctact tatagtatac agccatcaac ctgagatttc 8700

cctacatggt cttcctgcct tggctcctg tctcctgaat cctatggcct cttcttccct 8760  
 gggttactac attttgctag accgtatcct ccagtcatt ccttagaatg aatgtatgaa 8820  
 agttaaatt tctgaggtct cacatgtctt aaagtccct cactatggat tgatagtttg 8880  
 gctgggtata aaattctggg ctggccatca ttttccctca gaattttgat tgcattattc 8940  
 cattatcctc tcttttcaat attgcttcta agaattccaa aacctttttt tttttttctt 9000  
 tttgagacag tgtctcactc tgtcaccag gctggaatgc agtagtgtga tctcagctca 9060  
 ctgcaacctc cacctcctgg gttaagcga ttttcttcc tcagcctcct gagcagctgg 9120  
 gattacaggc acccaccacc acacccttta gtagagatgg gggtttgcta tgttgccag 9180  
 gctggctctg aacttctgac tttaggtgat ctgectactt cggcctccca aagtgtctgg 9240  
 attaaaggcg tgagccacca caccagcct ccaaaacct tttaaaactc tttctggaag 9300  
 ctttttaaaat tttcttttag tccccagaat tttaaaattt caattatgtg ccttgggtgtt 9360  
 cttccattat attagtcacc caagaggtac tttcaatctg gaaacttctc tatgttttgg 9420  
 gaaatgttct tgattagttt acaggtgatt tcttctctc cattttatct cttctctttt 9480  
 catgaaacta ctattaatcc aatgttagaa ttccttgact gatcatttaa ttttcttcta 9540  
 ttttccatct ctgtgtcttt ttgctctact tttctatgat agtcacagct ctatctttaa 9600  
 actcttgagt ttttcathtt tgatgtcatg attttaattt gcaagaggtg gggttgactg 9660  
 attctttttt gtagtatctt actcttggtt tatggatgca acatcttctt tgacttaagg 9720  
 atcataagat aggtgggttc tttgtttgtt tgtttgactg tttttcacc cttatgttaa 9780  
 ttttctacaa gtttctttcc cttcccccc tttttggctt ctatctccca cattagatgc 9840  
 tttctctggg ctcatgatac tctttgggtt tctttctcaa gattgacagg taggacttta 9900  
 aaacttggtg agcatgcggg tgaacttgt ctacctgaa tttcactgta gatatttttg 9960  
 agattgacag tgtttatata tttagatctc acctcctggg ttgatcaagt tatctgagta 10020  
 caccacagac cttttgcctg gggataaacc agaaatctgt ttcagaaacc actttgattc 10080  
 agtcttctct ttttttagtca tttcttcag ttccggaggt ccgtcatgct gatcattcca 10140  
 gagcccttta cagatcctag ggtacacact gcatgggttt caactttctt gttttgggtt 10200  
 taagatttgg ctttcaggag tctcctcagt ccgttactat tcattcaatc agcaagtcct 10260  
 tgagcacctg atttgtgcca gacattcttc taggtgttag ggatacctca gtgaacaaaa 10320  
 cagacaaaaa tctttgtctt ggaaatacac acactccagt caggggagag ggacaataag 10380  
 ccaaaggag gaaattacag cgtgtgctag aaggtgataa gtgctgtaga aagtaagtaa 10440  
 agtgggtttg ggagttgaga ttttggaag gggataatg atggcaattg taaatagagt 10500  
 agtcagagtt ctacattaga agtgaaatt caagtaaaga cttgaaggag gacagggaa 10560  
 tagccacatg gatggctagg ggaaggcttc caagctgaga ggacagccag agccaaggcc 10620  
 cagaggcagg agcatacctg gtagttttag gaaacaggag gccaggatgc tgagtggagt 10680  
 aagagggggc atgaaaggag aaacttgggt ccacgtgggt ctgacaggtt atttttgtct 10740  
 gttttgggcc ctgaaggcta ctattggact tggactctta ctctgaggaa atagggacgc 10800  
 tattgggacg tttgtacagg agcaatgtga cctgagtttt gtttgtaaaag gattagactc 10860  
 tggctgtggc attaaggcta ggctgtgggg gcaggaacag aagcaggggg accagttttg 10920  
 cagcctgtgc agctttccag ataagcaggg attgtggctt ggaggaggat ggtatagagg 10980  
 aggtgacaag aaatgactct atgtctggta ttagatattt ggccacagat ggcatttgag 11040  
 cactagagac ctggctggtc cacatggagt ttccataagc acataataca catcagattt 11100  
 caaagactta atatgaaaaa aaaaatttaa cgggccccgg gaattttttt cttttttttt 11160  
 ttttttgaga cccagtcttg ctctgtcacc caggctggag tgcagtgggt tgatctcggc 11220  
 tccactgcaac ctccgctcc caggttcaag tgattctcct gcctcagcct cctgagtacc 11280  
 tgggactaca ggcacctgcc accacgcctg gctaattttt tgtattttta gtagtgatgg 11340  
 ggtttcacca tgtgttcag gctggctctg aactccggac cttaggggat ctaccgcct 11400  
 tggcctccca aattgctggg attacaggca tgagccacca tgcctagcca tatcttgcta 11460  
 ttttctacat ggattacatg ttgaaatggt aatgttttgg ctattgtgga ttaaatagaa 11520  
 tatatgatta aagtgtattt catctatttc ttttaacttt aaaaaatatg tctgttagag 11580  
 gatttgaaat tccacatgcg gcttgcatth gtgacctgca tttcatttct gtggaacagt 11640  
 gccctttttg ggacatgctt tgaaggtgga gtcaacagga tttggcagat tacagacgag 11700  
 aggttcaag ggtgactcca agacttcggg gcagagcacc tggaaagaaag gggtaatat 11760  
 tagccaagat gaggaaggct gtcggtttg caggtgcatg ggcaggttag gagtttagtt 11820  
 ttgaatatgt tggaggtgtt tatgaaactt ttaagtggag atggaaaata ggcagttgga 11880  
 tgtgcaagtc cagggttcag ggagacagtt caggctggag atgaagatgt gggagtcga 11940  
 ggagagattg tattcaaata ttcaatccat gagacttgat gaaatcactt ctcttccaaa 12000  
 tgatttacag cctgcagaat ctttttccct atcttttagt gtttatgtct tcattttgtt 12060  
 tcattttatt ttcagttatt cactgtttta gtgagttttg agtaggagcc agattggatg 12120  
 catgctgtca attcaccatc caacactgta ttaactactt gaaactcatg tgggtgttcg 12180  
 gttgtttttt tgacctttta ttctggatgg aagagagatg cttatgaagt tgcagtaatc 12240  
 agtaagcctt cccacattgc tccatcagcc ttcttggag aataatgtct tctgcctttc 12300  
 ctgtaggcaac gaaggtgct- tgatcttgcc acggtgaaag cgaatggatt ggctgccttc 12360

cttctacaac	atgttcagga	attaccagtc	ccattggccc	tgcctttgga	aggtaggtgt	12420
atgtttctcag	ttaatcagaa	aggaagggc	agtcagtga	gatccatggt	taagagcaga	12480
acacacctcg	gttaacatcc	catatgctgg	cagtatagcc	tccctatgac	tcaatttcct	12540
tgttttaagg	ctagcaccac	cccgtctcat	tgggattttg	ggagcattaa	aaggacaaaa	12600
gcgtgtaatg	ttagctatta	gctttcatta	tctccacac	agtatactga	caattgggct	12660
accatatatt	gagggctaac	ttaaagggtgt	acttaccatc	caaactctca	ttatctgtac	12720
cgaaaagata	tggacacatg	ttttgagtta	gggctggtat	ctcttgatct	ctgaaattta	12780
gcagctcaca	atgggaaact	caagaaccaa	gtggatctag	agactctggt	atccctcagt	12840
gcccagggtc	accacccaaa	ctcaggaaca	ggaggggctt	ggaccgcacc	acttgaacat	12900
accaggcatc	ctgccagggtg	ctttatggac	aatgtctacc	ctttgcaaca	accctgagaa	12960
gtaggtggtg	tttttttcca	ccttatagat	gtggaaactg	ggcagggagg	ttaagtgcag	13020
agggagggga	agatgggtct	gattgtaaat	tgtcccccac	tacactttct	cttttcttgg	13080
gagaagaaat	gtcagttgta	aagagagagt	gcaagcctgg	cactcttttag	ggcttgttcc	13140
tacaccactg	tagggaaagc	tcattggcac	tgaagccccc	tgagctgtgt	gtgggtgctgg	13200
cagatgggtc	tatcacccctg	gactgtgtcc	tctgggcagc	aagcaagcct	gtgggcgggg	13260
tggctggaag	tctgtgcctg	gcactcgcga	gtgcaccgtc	tcattgaaga	acaggatcta	13320
aacatcagtg	cgccacagca	gggtgcgcgg	cacggagtgc	aggccctggt	ttggcccttg	13380
gttgaggttt	gctgttgaca	tcataagca	cagctagtca	ctgtaagacc	aggccagggt	13440
gcaagattcc	ccacacttct	aaaggtgaca	attggtgtat	ttatttctct	ataaaatgac	13500
attttttttt	tctggagaat	tttagtatca	ttggtgatga	ctggaaaacc	tgcatcagaa	13560
atcaggtcgg	aagaggaaga	tatatatctg	atatgtactg	gagaggaaga	tatctatctt	13620
atggtctaag	ttcagggatc	ctgggtatatt	cagagggcag	aaagctcagc	aataatcatc	13680
aactctggga	acagaggtga	cataaacaca	gggcgtcccc	tttgtgtgac	tgcatagatg	13740
catcagtgag	ctcagagctc	tatgaaaatt	acttgctagt	ttttgggttg	aaaatagtgg	13800
gccagtgttt	ggttgggggc	agtgaggctg	tgatggcggg	ggaccatgcc	aagctcctac	13860
cagcctggga	cgctaaacca	gcacttcccc	atttcttgaa	aggggaacta	aactctgaca	13920
caggaaatgg	tttgccttga	ttacttttcag	gatgagaaag	gaagagcact	ggccttccaa	13980
acacaccccg	tcctgaaaaa	ctctccctgc	atgggggtgca	tggggaggat	ggggaagtgg	14040
aggcaggatc	acagactcct	gttcgagtgc	tcagctgggg	caccccggtg	accccgaggc	14100
cttcccttgc	taggtccacc	cagatcaatc	aggatcatct	ccccatctcg	aagtttaact	14160
ttatcacatc	tcagagttcc	ttttgccacg	taaggttaaca	tattcacagg	ttctgagaat	14220
ccggacatgg	acatctttga	gggtctattg	ttgtgcctac	tatatccatg	aataataatg	14280
ataataagca	ccattttttg	agagtttgcc	atgtcagata	ttctttttaa	ctgtatttta	14340
tctcgctgcc	tctgaaaaaa	atccttccag	gtgtatatgt	tccccatttt	tacagatgag	14400
agaactgagg	cccagaaagg	ctaaatggct	tgcccaagtg	tatggtggac	ccagggttttc	14460
aaactcaggt	gtgtctggct	tcagagactg	ggctcctgag	cccttaagcc	ctttgttccc	14520
ctttagaaaa	agtcacctga	ggctgagtgg	tgaagggatt	tatccaaagc	cacccggcca	14580
ctatggcagg	acagatatca	gaatacaggt	cttccgatcc	cagcccagag	ccccttcccg	14640
tcacttagaa	ctcctcctgg	tgctagtaat	gataacggca	gtcactgatg	tcttttgagc	14700
acttactttg	tgttgagcac	ttacactgtg	ctaagcactt	gacataggtc	atcttagttg	14760
atccgtgtaa	aactctgtga	ggtagtgaac	aacatttctc	ccaccttaca	gaggtggaaa	14820
ctgagggtta	ggaagtttcc	ttgactgtcc	tcaaagtga	cagcttgtga	atggaggagc	14880
caggatgggc	gcccgttggc	tctcctatcc	cttcagttat	gtcagcgtcc	cccgcagcag	14940
cccatgtct	ggttaggtcc	cgtcttcacc	atggtgccac	cttcactctgc	ctcttcttct	15000
gccttccagc	tgccacatgc	aagaagtata	tggccaagct	gaggaccacg	gtgtctgctc	15060
agtctcgctt	cctcagtacc	tatgatggag	cagagacgct	ctgcctggag	gacatataca	15120
cagagaatgt	ctgggaggtc	tgggcagatg	tgggcattggc	tggatccccg	cagaagagcc	15180
cagccaccct	gggcctggag	gagctcttca	gcaccctgg	ccacctcaat	gacgatgcgg	15240
acactgtgct	ggtggtgggt	gaggcgggca	gtggcaagag	cacgctcctg	cagcggctgc	15300
acttgctgtg	ggctgcaggg	caagacttcc	aggaatttct	ctttgtcttc	ccattcagct	15360
gccggcagct	gcagtgcagt	gccaaaccac	tctctgtgcg	gactctactc	tttgagcact	15420
gctgttgccc	tgatgttggt	caagaagaca	tcttccagtt	actccttgac	caccttgacc	15480
gtgtcctggt	aacctttgat	ggctttgacg	agttcaagtt	caggttcacg	gatcgtgaac	15540
gccactgctc	cccagccgac	cccacctctg	tccagaccct	gctcttcaac	cttctgcagg	15600
gcaacctgct	gaagaatgcc	cgcaaggtgg	tgaccagccg	tccggccgct	gtgtcggcgt	15660
tcctcaggaa	gtacatccgc	accgagttca	acctcaaggg	cttctctgaa	cagggcatcg	15720
agctgtacct	gaggaagcgt	catcatgagc	ccggggtggc	ggaccgcctc	atccgcctgc	15780
tccaagagac	ctcagccctg	cacggtttgt	gccacetgcc	tgtcttctca	tggatgggtg	15840
ccaaatgcc	ccaggaactg	ttgctgcagg	aggggggggtc	cccaaagacc	actacagata	15900
tgtacctgct	gattctgcag	cattttctgc	tgcatgccac	ccccccagac	tcagcttccc	15960
aaggctctggg	accagtcctt	cttcggggcc	gcctccccc	cctcctgcac	ctgggcagac	16020

tggtctctgtg	gggcctgggc	atgtgctgct	acgtgttctc	agccagcag	ctccaggcag	16080
cacaggtcag	ccctgatgac	atctctcttg	gcttcctgg	gcgtgccaaa	ggtgtcgtgc	16140
cagggagtag	ggcgcccttg	gaattccttc	acatcacttt	ccagtgcttc	tttgcccgct	16200
tctactctgg	actcagtgtc	gatgtgccac	cagctttgct	cagacacctc	ttcaattgtg	16260
gcaggccagg	caactcacca	atggccaggc	tcctgcccac	gatgtgcac	caggcctcgg	16320
agggaaagga	cagcagcgtg	gcagctttgc	tgcagaaggc	cgagccgcac	aaccttcaga	16380
tcacagcagc	cttcctggca	gggctgttgt	cccgggagca	ctggggcctg	ctggctgagt	16440
gccagacatc	tgagaaggcc	ctgctctggc	gccaggcctg	tgcccgcctg	tgtctggccc	16500
gcagcctccg	caagcacttc	cactccatcc	cgccagctgc	accgggtgag	gccaagagcg	16560
tgcatgccat	gccccgggtc	atctggctca	tccggagcct	gtacgagatg	caggaggagc	16620
ggctggctcg	gaaggctgca	cgtggcctga	atgttgggca	cctcaagtgg	acattttgca	16680
gtgtggggcc	cactgagtgt	gctgccctgg	cctttgtgct	gcagcacctt	cgccggcccg	16740
tgggcctgca	gctggactac	aactctgtgg	gtgacattgg	cgtggagcag	ctgctgcctt	16800
gccttggtgt	ctgcaaggct	ctgtagttag	tgttactggg	cattgctgtt	caggtagtgg	16860
ggagcaccat	caaggctaag	tgtgggagca	ccgagctggg	ctctagaagt	ctggggccag	16920
cttcgcctct	gccacctg	tttgcaacac	tgcccagatc	ccttccttcc	tgggccttaa	16980
tttcaataatg	tgatgatgac	agccacactt	tattgactgg	cctatgtgct	gggtctggtg	17040
ctatgcttcc	cggaaatgacc	tcatctaate	tctacaacca	ccctgggggg	taggcaggaa	17100
tgttattatc	tccattatcc	ttgacttgag	gctcagagaa	gtgaagtaac	ttgtccagga	17160
aatggcagag	ctgggggtca	caaattgcat	cattctgatt	acaggtttcc	tgccctccac	17220
cagtctatgg	atacacttca	gaggctccct	gaaaaccttg	aggctcactg	cagaaagtgt	17280
tgtgtagtag	gtgtccgtat	caggaacaac	accaaatacag	aggtgacttg	tgccccatca	17340
gagactttaa	cacccaacc	agatgggaat	ttcaggaccc	aagaaataga	aagtggctgc	17400
agggttacaa	ctactgttgg	attcctgagg	tagcacagtg	tccaaacagg	atttcagcac	17460
tacccgtatt	gcttagagcc	ccagccaaag	atgtgaggtt	ttgccctttg	gagaatctgt	17520
gcccctgaac	tcgggggcct	ccttccacat	cttgggggca	ggcaagggca	gaggggtgtc	17580
ctaggcctgc	ggatcagcat	gcgacagatt	ccccaacatc	cttcagctt	gaaaggggat	17640
tgccctgctt	ctatttagaa	cctataggaa	agcagaagtt	ctagattgaa	gttaaaattg	17700
attcccagcc	tccaggggct	ttgggctaca	cctggatgac	cttaattgac	cctaagcatg	17760
ggacaaacca	cttcctgaga	gtattaggat	ggtatacatc	ttctctgggg	gcaaagcaac	17820
aagatttatt	tttcatcatg	gaccaaacac	atggataccc	actagaaact	gtgtagttaa	17880
ttttgttaac	cctgacatag	ggaccatggt	cttttaggtta	aagcataata	acaacataat	17940
acataacata	tatagcgaat	atatatatgt	attatatgca	atgaatgtaa	atatgattat	18000
acccatcatg	gtcttgagg	aaacagatga	cacacttaa	atgggtgttt	tgaggagagt	18060
ttgaaaaaca	gattgtttac	aagccatggg	caggagttag	gaagagttag	agggttggtg	18120
caggggctcg	gggttagtaa	cagctggggg	agggtagact	tgaaggggga	aggggaggga	18180
gactaattag	ctggggggaa	ggtatggaga	cggtgcctg	agcttctgca	aagtgggaaga	18240
atactgcttg	gcctaactc	ctcaccccaa	ctcttgctcg	tgccagcgc	cttccaccag	18300
ctggaccatc	cagggaggcc	gagtgggctg	tctgctggag	tagtccccag	gcatacagct	18360
cccaggagcc	agggacgggt	agagaagggg	gagagtggat	ctggccaggc	aaatggaaaa	18420
cagccagcac	caaaactctat	ttccctagga	gggaggatca	tgatactttg	agtgggaatt	18480
tggaacactg	tctgttgagg	caatttccct	gatagaaata	agaatgtgca	ttttcctggg	18540
tagtagactc	agtttttacc	ccaagaggcc	aggcatcact	ggcctgtgtg	atcctcatag	18600
gtcagtcctat	ctctggaatt	cttgaatgga	tcatccatcc	ttgattaggg	atgtccccgt	18660
gattaccagg	gtgtgcagaa	gggctctggg	aaacctgtgg	gtctgtctct	gtgttcagag	18720
aaaggtgagg	gtggcctggt	tctagctcat	ggtgtcaga	ctgtggtgtg	taaaggcact	18780
cgtggcaatg	cagattccctg	ggcctgcctc	tagtgattcc	cattcagtag	gtttgggggtg	18840
gggcccaggga	aatctatatt	tttcacagac	accctggtg	attctgatac	aagtgggtctc	18900
gccttgagg	aactactggt	ctgcagcaac	cagcttggtt	ttccattagc	aattactgtc	18960
cttgagcgag	ttttactgct	cttcacctta	cacacactaa	aactgccaa	gccgtagggg	19020
aggggaagca	accatgaggt	tgtctgtagt	gcactgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	19080
tgtgtgtgtg	tgtatgagag	agagagagag	attgagaaag	agagggaagg	aggaaggggg	19140
agggcacagg	ctcctctccc	acagtgccaa	cctgcctctc	tcccacttga	agcgtttcca	19200
tgccaactga	aatcctcagc	ctctaggaaa	ccctatatac	acagtgcctc	tatataggtt	19260
tcttttagact	ctggctctct	cagactctag	agtgtggct	ttaaaagttt	tatgttacc	19320
acagagagag	agcacgcacc	accatgtaaa	catggaacct	aagtttcaca	aatgacttc	19380
gctttatgaa	ctctgagaca	ctctgctctc	ttctgttctg	ttctatttcc	attttagaaa	19440
tgtgtctcag	gaccttcaaa	atgatttgca	tgacctgcaa	cctgcagtct	gaaaaatcac	19500
tgcaactacag	aagtggccat	agagggacct	tcaaagcctt	ctgcacaatg	tcatgggttaa	19560
gagtgggggt	tgagaccaag	ccgcctaggc	ttctttctca	tatgtgccgt	acaaccttgg	19620
caaagtcact	tcgcttgtct	gtgcctcagt		cgaatgctca	taataatggt	19680

tcccatattca	ctggccttggt	gtgaggatga	aatagtggtta	ttattgagaa	gtggtaaggg	19740
tagtgatcag	tgctagcgat	catgattcta	ggtgactttt	actgtgtacc	gggtgctcac	19800
aaggctttat	gtgcacagcc	tggtgaggct	gataatacta	ttgttccctc	tttttttttt	19860
ttggaacgg	agtctcgttc	tgttgcccag	gctgggggta	cagtggcaca	atctcggctc	19920
atgcaatctc	tgctcccg	gttcacgcca	ttctcctgcc	tcagcctccc	aagtagctgg	19980
gactacaggc	gcctgccacc	acgcccggct	aatttttttg	tatttttggg	agcgacaggg	20040
tttcaactgtg	tttaaccagga	tggtctcgat	ctcctgacct	cgtgatccgc	ccgcctcggc	20100
ctcccaaagt	gctgggatta	caggcgtgag	ccaccgtgcc	cggcctgttc	cctcttttat	20160
agatgaagag	accagcaaatt	aactagtaag	togctgatca	ggatcacaaat	atccagctga	20220
ggcactccag	agcctgagct	gttaaccatt	cagtcagggc	ctcccaagtt	tgccataaaga	20280
taaagaatca	tgtycacagt	tgtaaaata	tacagattcc	tgggcccac	ccgcagata	20340
cttgattgcc	agctccaggg	tatgggctgg	agaatctgtc	ttttaggga	gctttcagat	20400
gatgtttgga	tcaggtgagt	tttgggaatg	gtgcccgaag	aggagtggca	gacagggcct	20460
gctcggcagg	gactagcctg	ttggagtggg	gccattgggg	ttaaggactg	ggcagcaggg	20520
cctcactaac	cacagcctat	atgcctgttt	ctgaagtgtt	ggccactctc	atccagctgg	20580
tctactgtct	gctgacctag	atgatggtaa	attgtcccca	ggggtagcct	gtctagtcca	20640
ggctgcacct	ttcgcataata	tcagctcctt	tccaccatca	tcccctttgt	gaggtcgtgt	20700
tgattatcat	gttctctttg	cagagatgga	aacattgcct	caaattagct	ctgtcatttc	20760
ctaaggattc	cagggttctt	tagtaggggg	tctggatcct	acgtcctggg	ccatcccat	20820
catagtgcac	cacgtcacct	ccctggccag	ggaccgtggg	gtctccactt	ttttgggggtg	20880
ctccatctat	gcagggtttc	ctggaagcac	agatgctggc	acttcaggga	tgaatgaaag	20940
tctttttggg	ggattttag	atttttttct	tgtcttacta	gctccatttt	caaagtatt	21000
tattttgtct	ctttagtttg	cgcgataaca	atatctcaga	ccgaggcatc	tgcaagctca	21060
ttgaatgtgc	tcttcactgc	gagcaattgc	agaagttagc	gtaagtacgc	ctgggctgtg	21120
gacaatgggc	tccaagtgcc	ctggtctcac	cccaggctgt	gcagcctggg	aagctgtgag	21180
tgatgggctg	gggcaggggc	tgtttgcatg	atgggggggtg	cagggtgattc	ctgccagag	21240
gggaagggca	accctgggat	ttggtgctca	ctgtccaatg	tgctttgtct	ctgtgtctcc	21300
tctcttctg	aactgaacag	tctattcaac	aacaaattga	ctgacggctg	tgcacactcc	21360
atggcctaagc	tccttgcatg	caggcagaac	ttcttgcatc	tgaggtgagc	ccagggtttc	21420
cttattccct	ggaaactatt	ttttgcccc	ttcctgagtc	agtctgatct	ggtcttggcc	21480
tggaactgcc	cacactggct	cctgacctcc	tgattgaatg	cagggacagt	gtctcatttt	21540
aagcagggggt	tctctaattg	tgtgatctcc	ccagtaaaact	ctggactagc	tctgtctgag	21600
acttcctgtc	ttttgacctt	tagcccgtag	ggcaagaaag	cttttctagg	cccctttcct	21660
tttctgtgtc	taagagtgtc	acagctttct	ggggttactg	agttccacga	tgcatgttga	21720
gctcgtcctg	ctgggggagg	catacacagt	tacttgccac	cccagctgtg	gcagcgagtt	21780
gctgcaacac	tcccaggagg	tcctttcacc	actcagagca	tgcaagggtt	gcagtccatc	21840
tggttctgca	tttctgtctac	tccagtgtct	cccagtttca	acaggagtct	ctctctctcc	21900
tacctgatgc	ctttaaattg	cccctctagc	tggccgctgg	gttggcctgg	cttctctctc	21960
cttctctctc	tctcagatat	tcttgctctc	tgtgatttgt	gaggcagtaa	aaaaagacaa	22020
agtaagaagt	tgcttccatc	tattctttta	cctcttgggc	tgggtttgtg	gatgggagcc	22080
gccattttta	aatggcgggc	cacatagctc	agtctcggca	agggtactgt	agatcagaac	22140
cacagggtgcc	aatttgtaca	aaggactcag	tctgtctacc	actgcctgat	ccctcagact	22200
cacaagcctg	gaataggctg	tggccagacc	tggctggccc	atccctgaga	agggtgctag	22260
tttcagaaat	ggaggctgag	tttgtggcca	acacagtagt	cctccggtat	gtgcaggaga	22320
gatgttctaa	gaccccagtg	gatgectgaa	accatggaga	gtatcaagcc	ctacacatac	22380
catgcttttc	ccaataccta	cacacctgca	ataaagtgtg	gtttataaat	taggctcagt	22440
aagagagtaa	tagcaactca	taataaaata	gaacaattat	aacaatcaat	atactataat	22500
aacactatgt	gaatgtggac	tctctccatc	tccctcaaaa	tatcttcttg	tactgtactc	22560
acccttcttc	ttgggaagat	gtgtggtggt	aaaatgcctg	tgtgatggga	ggaagtgagg	22620
tggatgacgc	atgcagcact	gtgctctagc	gctgggctgc	tgttgacctg	accacacttc	22680
agaaggagaa	tcactctgtc	ccagagatcc	ctaattctttg	agcaacaatg	aggctggcag	22740
ctggatgtca	ggagcagacg	atcttgatga	ttaccaaagt	ggagcgtata	gagcgtggat	22800
gcgctggacg	gggggctgat	tcacgtcctg	ggtgggatgg	agctggatgg	cacgtgatca	22860
gaatagcatg	caatttaaaa	tgtatgaatt	gtttatctct	agaattttcc	atttaatat	22920
tttggactgc	agttgatttc	agataactga	aaccatagaa	ggcgaagctg	cggataagca	22980
gggggcaggg	attaccgtat	atcattgtaa	tagagagcac	aggctctgga	gccagactgc	23040
ccgagggttg	aaccctcatt	agctgcgtga	cctcaggtca	gcccattgtc	tgtgtgcctc	23100
cgtttccctc	tctgtagaat	ggaggtaata	accctggcta	cctcacaggc	tgtagtgtg	23160
agcaagcaag	ttaatccaca	tgaagggctg	caccgtctgg	caggggcttt	atatagtaag	23220
cgagtggctg	aaagatgatg	ggtaaatcac	acaagcactc	agcttgtttc	tccttatgtg	23280
agtccggtcc	tccaagcagg	gattcaatgt	gccacccatt	tattggggaa	aagtcctaaa	23340



aggggaagtg ggggaaggag ctgggggagg ctgggaggtg tgtccctgag tgaaggagag 23400  
 aggggaaggaa ggaaggttga gactgggcac cttggacttc agtgcagtcc taagacatct 23460  
 tggcaaggct gatgaggagt tcttgaacca aattcaccag gcaggggagc ctgatgtctc 23520  
 aggcaggggc tggcaagtgc agatgcgagg atgttagatt ttggagcaca gcagctgggg 23580  
 cccttggcta cctccaagga gctgaggctg gagacctgaa aggcgagttc tcctagctgc 23640  
 cacaccctt ctccaaggat acaataatat ctgccttata ggattgttgt gagctgagtg 23700  
 gcttgacgtt ccttgaaaga atgaaagcgt atagttatcc caggaagcct agggttgcag 23760  
 gtgagagctc tggggcttct ccgaagctct ccgagggtgc tggattcagt tgcagcagga 23820  
 gccttccttg ctgggatctt cccccacccc tagccttggc cctccctctc tccttccttt 23880  
 ctggaaggct cagtgggccc caccctccc tccagccacc tggacctgcc cagcgctctt 23940  
 gtgcaacagg taaagcctac ctgtagcaac aacagatctg ggaaggctgc agagggcacg 24000  
 atggggctcg gatcgagggc ggctgagacc agagggaag gtgtgacctt gagtaccctt 24060  
 cgctgtcccg gggaaaccac ctcccaggac agctgcctac tgtggctcct gcctggaatt 24120  
 gtcacactgc tgtgcaaaaca gcgtcccgt gcccttttcc ctttgcctgg gaaaaatgaa 24180  
 gttgtgggag ccgctgagta aactagacct agcagcgagg gcacctgatg tggctgctgc 24240  
 ctcccgggca ggtcttcaat gctttcttcc tgtgtttccc tggccagggc acagacggcc 24300  
 ctccctttct ccctgccgct gtgttctctc agcctcctct gtcttcctt ccaggctggg 24360  
 gaataactac atcactgccg cgggagccca agtgcctggc gaggggctcc gaggaacac 24420  
 ctccctgcag ttcttggggt aggttggatt ccaggaagag ggacctgat ggaggggctt 24480  
 gggacttttg aggttttagg ggcaggtgaa actcttcagc caggaggccc cagaggcagc 24540  
 ccagctccag tggggaggac aagccaggga gagagtgggc ggcccttgac tgccaccttc 24600  
 atacttggtc tatgcctgac aaacaggaag tttaggatgt tggggctagg ggaggacagt 24660  
 gccacggagc tggctgacag aagccctctg atcctcaggg ggcgctaggg ctgtacttta 24720  
 gctgcatatt aaaaccacct ggaagcttct aaacactatt gccaggcctc ccacccaga 24780  
 ctgatgaaat gcaaataatct aggtgcaagg ccaggtatc aggagtttta aaaagcttcc 24840  
 caggggatgt acagccaggg gtgaggaccc ctgacctaa aaagagaagg aatggggaa 24900  
 ggataggaag gcaccagga taagaggggc tgtgctaggt ccctcgagc tcttgcctcc 24960  
 tgtaggacca tgctagggcc tgccaggag gggagtacc caacctgcag cccagggtg 25020  
 ggcttctctt gtttgcctag caccaggct tgacctgtg ctgtttccag cagcctctct 25080  
 cctatcctgt catgccctag tgtgaactgg agtccatttg acaagaactg ggagttttag 25140  
 aacctgggac tgtaggaaga gagaataacc ttagggccta ggtgttccag ccctattcac 25200  
 agggaggcaa gttgccccca agctcagttt tttgttttgt tttgttttgt ttgagatgta 25260  
 gtctcactct gttgccagc ctagagtga gtggcacgat cttggctcac tgcaacctcc 25320  
 gcctccttgg ttcaagcgat tcacctgcct cagcttctca agtagctggg attataggca 25380  
 ccacaccaca cgcccagcta attttgtat ttttagtaga gacagggtt caccatgtt 25440  
 gcccggttg tcttgaactc ctgatctcag atgatccgcc cgctcggcc tcccaaagt 25500  
 ctgggattac aggtgtgagc caccgcaccc ggcccccaag ctgagtttga gccacaaat 25560  
 ggactatggt gctctagaaa tcaacatctt ttccacactg cattagtagc aacagagtct 25620  
 agaacaaagg aggccacagc cccactgaac tctcttctgc ttgaggtcac atctgccaca 25680  
 tcaggggtat ttacctctt caacacatat ttattaggc acctgtctgg gccaggcgtt 25740  
 gtgctaaaac ccccaaacgc tgtcatatga tacaaagtgt tctgtaactt gcttggtttt 25800  
 tttttttgt tgtttgtttg ttttgtttt ttttgttgt tgttttttt tgcttcgcca 25860  
 tatattatag gaatttttt aggtcattat gacctcttta ttacttaat tatctattta 25920  
 tttattttac taatatttt agaaagggtc tcaactctgt acccaggctg gagtgcagt 25980  
 gttgcaatca tagctcattg tagccttgaa ctctgagct caagtgatct tcctacctcg 26040  
 gcctcctgag tagctgggac tacaggcaca agccaccatg cctggccgat atttttatgt 26100  
 tttgtagaca cggggtctca ctatgttgcc caggctggtc tcaaaactct gggctcagg 26160  
 gatcctccct cctttgcctc ccaaagtatt gggattacac aagtgcagca ccttgctcag 26220  
 cctgacctca tttttcaaag agctgcagag tgttacataa tgtatttaac tggctacttt 26280  
 ttgatgacta ttaagttgtt ttgaggtttt ttgttattac agtgtcatat ccctggggca 26340  
 cagagcagtg ctggcacata gccagagctc aatcgataca tacctaata gaagaaagta 26400  
 agtggacatc ctaattcagc cattctttgc taacttgtgt acatacctgt ccagggtagg 26460  
 tccctagaat acagtcaata agtcagaagg tgtgagttgg gatctacctt ttggaagg 26520  
 atgttttcaa actacagtga gtcagaggag gatggcccag aagctggggg agttgaagct 26580  
 gatggcgtga aggaattagg ggtgttagga agaagcagga gataaagagc tagcttcag 26640  
 aagaagtgtt agacttgta tgggcaggta ctggagggt gctaaggact tgtgggtggc 26700  
 agttaccagg aagcgtatct gaactaagt tcagaaaaag tgcacaact gtaaattact 26760  
 ctgtcagtg agttctgtc cttaaagggt agggctgggt agccctctac tattctctaa 26820  
 gtctgtaagt taaagccact gaaaactctt ggggttaagt tggccatccc acccaaaaga 26880  
 tggaggcagg tccactttgc tgggaccagg agceccagtg aggccactct gggattgagt 26940  
 ggtcctgccc ctctggctgg gactgcagag ggaggaggac tgttagttca tgtctagaa 27000



acatatcagg	tactcactga	cactgtctgt	tgactctttt	ggccttttca	gattctgggg	27060
caacagagt	ggtgacgagg	gggcccaggc	cctggctgaa	gccttgggtg	atcaccagag	27120
cttgagggtg	ctcaggtaag	cttcagagtc	tatcctgcag	ttttcttggg	gagatcaggt	27180
gaagagggag	gagctggggc	cagttctgaa	ggtctttgaa	ctttatttct	accccaaat	27240
gttaggcaat	ggagtaagga	aaaaagacca	ttggatttca	agagaggaca	cttgagtctt	27300
tctgggtgac	ttggaatgt	cccttgtcct	ctcaggggtt	tgatacagta	tctgtaaatt	27360
gaagatattg	ggctggatca	ggtacatttt	atcttaagg	ccaattccaa	tccattggtg	27420
gtgggtgccc	agtgaccac	attaaaaaga	attctaaggc	tgcacctggg	cttaaagaag	27480
agcactataa	tcaattagt	atgtctaaaa	aagctaaaaa	aaaaaaaaaa	gagcactgca	27540
ttcaattagt	gatgtctaaa	aagggtagaa	aaaaaaaaaa	aaagaaaaaa	gaaagagcac	27600
cgcaatcaat	tatgtatgtc	tgaatggag	cagaccagga	gagcaccacg	aattttgccc	27660
tccataggtt	agctcatctc	tgaggtcttt	ccctgctctg	acatactttt	gttccatgat	27720
tacctccagc	ctggtgggga	acaacatttg	cagtgtgggt	gccaagcct	tggcactgat	27780
gctggcaaa	aacgtcatgc	tagaagaact	ctggtgagtt	tgggggattc	tctgctctgg	27840
ggaagtggat	cacaatctct	gttgatcccc	tggcctcatc	cataggagcg	gttgtgtgga	27900
cagacaaaag	tggtgatttg	agtgattgac	tgattgattg	atttgttttg	tctttatatg	27960
tactgagtgg	tatgaagctt	atagagcctg	gtatgtacat	gctaattttt	ttatttaata	28020
aaatatatgg	gtttgctggt	ttggtgactg	cctccacatg	gcataagtgt	taagagcaca	28080
gactctgtaa	tcaagcaggc	cgtgatctta	ggcaagttaa	ataacaattt	cagaatctca	28140
agtttcatgt	ctgtaaaatg	agggtaagaa	tacttccaac	cataaaggat	ttttgcaaga	28200
attagataaa	gtagtgcctg	tgaagacctt	aatatagtgc	ctggcatatt	tgtaagtgtc	28260
ccataaatgt	taaatagaa	taatggcagg	gttactacta	ctattactgc	tgtgtgtgct	28320
gctgctgctg	ctacaactac	tatagtactg	tgactactac	tactaataaa	gttttgttat	28380
tttaaagtga	ttttgagttc	ctaggagcac	tgggtattca	agtcttaggt	cattttggaa	28440
ggtgtaattg	agttttgata	gttgaaagag	gaacatgaa	tcatgcttat	actgttgacc	28500
tgaaagcagat	tctaagtttc	tcatccttta	gatgccacta	gtatagtttt	ctgacatgtt	28560
ctgggcagct	tcagattatg	tcagggagat	aaaatactga	atgtttgatt	ttcccgggaa	28620
gcagaaaggc	actgaacat	atgggcattg	ccataaacag	attttatgga	tggaccttgg	28680
ctgttgcaag	gcttactagc	tctactcaag	tatgattgat	tctatcctga	ctggattttg	28740
ccacttggaa	tttcttagta	gaggagaacc	ttgttatgag	agcatcagtt	atgattactg	28800
ttaaaagaaa	aactttaggc	aaattaaatt	tagcagaact	ggtttgaaca	tacagcaatt	28860
tatgaattgg	gcagatttca	gaactgggag	tgctccaccc	agcaaggtag	gcaagcagta	28920
tctatagaca	ggaaaaggaa	gtgatgtaca	aaacagcttg	attggttgca	gctgggcatt	28980
tgccttatat	gggcattggt	tgataggcca	ttttctttat	atggatatag	actgatcagc	29040
tggtagactg	tgctgactg	aagcctggct	gctgtgattg	gctaagactt	agctgtttgt	29100
tataaggata	tggtgttagg	ttgcagtttg	ctacatagga	actcaaagta	cagaggcagt	29160
ctcaggccaa	atttagttta	actatatgtt	aagctgcagg	tgacagaata	cctccatcta	29220
tagagggttt	aacaaggaaa	gggtttat	tttctgtat	aggcagctgg	atgtaggcag	29280
tgtaggggtt	gtacagtggc	tacaagaggc	caggaggggt	ctcagctctg	tctcattctc	29340
ttcctgttcc	atcatcctta	gcctgtaact	tcattcacat	ggttgggtgt	ctcatgatca	29400
caggatggct	gctccaggtg	cagcactact	ctgttattcc	cggattcgat	ctatatacc	29460
aggaaagcca	tctgggttct	ctcctttaa	aagcattcct	ggaagcccca	cctgtcgact	29520
tccccttatg	tatcaaccat	gtgtatgtca	cttgaccaac	ccacttgat	gttgtttgac	29580
cagccctggc	tgcaatggag	agtgggaaat	acagtttttt	caccaagtgc	atggctgtcc	29640
aatgaaatg	agacttccat	taataaggaa	gaaaggaaag	atggagatca	ggaagctggg	29700
ggatcaggga	acttattaca	ttgagagccc	ttggagtga	ttctcttgca	aatatgtccc	29760
tggaattgag	aatccccaca	acgtctttat	ctgttctttc	tttatccatg	agtttgggtt	29820
ttcagatgtt	ggatttccta	tatggggggc	atgtgagttc	atcatcttcc	ataatcaatg	29880
ttgtatcaac	tggattttct	ctcttcttct	caccagcctg	gaggagaacc	atctccagga	29940
tgaaaggtga	tgttctctcg	cagaaggact	gaagaaaaat	tcaagtttga	aaatcctgaa	30000
gtaaggaaacc	cataagcagg	aaacaggaca	ataattgctg	gcctttggaa	ggggcatttc	30060
tgattaagat	ctgggcogct	ctccgctggg	ctaactcatg	tgagggtggc	tggtagaaac	30120
gcttgccttg	gtctagggtg	acaaggatc	cagtgcgaag	tgtttatctg	ggaggtgttc	30180
ccagtaaatg	ctgataggag	agtgggtga	tgagatggg	aagtgaagg	aaccaataaa	30240
ggggagttat	caagccagtt	atcaatgagg	gaaattggag	ctcagtactc	tggggcactc	30300
ctggagccag	tgcaaacac	acatggtcac	ctaccaacc	aatgggcaag	aaagccatgg	30360
catttatcca	ccaacctct	gtccttccta	tgttgatgtg	cgctcatggg	gcaactgattc	30420
tccagcactt	ccagctcacc	ctcaccagc	tgaacatgct	tctgggggtc	ggagaatggc	30480
ctcaggcaga	gagtggcagg	tcttctctgc	aagcagtggc	tggggagggtg	atgtgatggg	30540
gagtactgtg	gcctcctcca	gtggctgact	cagtggcttg	ggacttgtgc	cacaaagaga	30600
tggacagctc	aggtgaacat	gaaccacct	atgaccatc	atgggtttgt	caggggtgctc	30660

tctgaggctg	atgccaaaat	tcttattttca	agtagacctc	aggaacccca	tcagatggct	30720
ccttttgctg	gaggaaagt	gcatctgcct	aggcaaatgt	ggctcctagga	aaacgcttgc	30780
cttttagagac	agacagacag	acagctgcct	ctgtgagtgc	cagctttgct	gccaggctgc	30840
taccactct	ggcgacactc	atttgtgttg	ctttcacaa	ctaggaagtt	tccaaatatt	30900
tggagaaaac	acttccacta	attattttggg	tggaaatggg	ctgggaagtt	ggggtgaagc	30960
ccggatgtgt	ctgagccaga	tgccagcttt	gcactgaggg	tcggcctttg	ggaataccaa	31020
gcccattatc	aaccaggtgt	ggatatggca	ggtttgcctt	ccctccttgt	cacagcctta	31080
ctccacttga	ctcccatgga	tgccaggcaa	tgaggctggg	gttgggtccca	tgccaccctg	31140
tcatacgcct	tatttttcag	catcctaaac	tatatcatcc	cccacaaaa	ttgaacttct	31200
gatatatcct	tataaaaaa	gagaaatgcc	tacatctttc	ttttccagga	ttagtttctg	31260
ccaagagttg	gttgagagcc	caggtctgct	gggtgcagt	gctcacacct	gtaatccag	31320
cactttggga	ggctgaggcg	ggatgacac	ctgaggtggg	gagttccata	ccagcctgac	31380
caacatggag	aaaccccatc	tctactaaaa	atacaaaatt	agccgggcgt	ggtggcatac	31440
acctgtaatc	ccatctactc	aggaagctga	ggcaggagaa	tcacttgaac	ctgggagggtg	31500
gaggttgcca	tgagccaaga	tcacaccatt	gcaccctaga	ctggacaaga	gagaaacttc	31560
catctcaaaa	aaaaaaaaa	ggatgagaaa	aataataatt	taaaaaaaag	agtcaggct	31620
ctggaaccag	acagcctggg	tcttaccct	gctccacat	taccagccag	ttcttcttgg	31680
atgagtgcct	cagttgcctc	aagtgtaaat	ggagataatg	gctggacctt	cattataggg	31740
catgagcatt	cactgagaga	atgtagctaa	caaaagtgg	ttgtagggtg	gagcaaaagt	31800
aattgtggtt	tcagaccatg	aactttaaat	tattataact	aggctaaaa	acatctttat	31860
taatcaaaat	aggaaccatt	aaaatcaaca	catttttgcc	aataagaaat	aagtttgttt	31920
attcctgtag	cataaaaaat	catgcttcgg	gattcaacaa	actcttgga	agcattttct	31980
gcacccctct	ggttgtggaa	gcatttttcc	tgcaaaaagt	tgtcaagatt	cttgaagaaa	32040
tggtagttag	ttggctagag	gtcaggtaaa	tatggcggat	gaggcaaaac	ttcatagtcc	32100
aattcattca	acttttgaa	ctttggttgt	gtgacatgca	gtccggttgt	tgctcgaggag	32160
aattggaccc	tttctgttga	cgaatgccgg	ttgcaggtgt	tgcaagtttc	agtgcatctc	32220
attgacttgc	cgagcactat	tctcatatgt	aatggtttcg	cagggattca	gaaagctgta	32280
ggggatcaga	ctagcagcag	accacagctg	accatgacct	tttttttttg	gtgcgaattt	32340
gcctttggga	agtgccttgg	agcttcttct	cgggtccaacc	actgagctag	tcattgccag	32400
ttgtataaaa	tccacttttc	atcgacgctc	acaatcagat	caagaaatgg	ttcgctgttg	32460
ttgtgtagaa	taagagaaga	tgacacttca	aaatgacgat	tttcttggtt	ttcactcagc	32520
tcatagagca	cacacttatc	gaggtttttc	acctttccaa	tttgcttcaa	atgctgaatg	32580
accatggaat	ggctgatgtt	gagttctcaa	gtagtgttaa	gaaaatcagc	tttgatgatt	32640
gctctcaatt	ggctcattgtc	agcttctgat	ggcctgccag	tacactcctc	atcttcaagg	32700
ctcttatctc	cttcgcaaaa	cttcttgaac	caccactgca	ctatacgta	gttagcagtt	32760
cctgggcaaa	atgcattgct	gatgttgtga	gttgtctccg	ctgctttaca	acccattttg	32820
aattcaata	agaaaattgc	ttgaatttgc	tttttgtcta	acatcatttt	catagtctaa	32880
aataaaata	aaataaacag	aaagtattaa	gtcattagca	aaaaatcata	aagtgagaat	32940
tgtgcattaa	aatgatgtat	agcataacca	catattttta	agaatgtatt	ccaatatcaa	33000
atggcaaat	tcaacaatgc	aaaaactgca	attacttttg	caccaatcta	atagaagttc	33060
aataaatact	ggcaattaca	attggcattg	ccttagggtc	aaacttgaag	acattcctga	33120
aatttgtggga	aagggggagg	acctggagtg	gacattattg	gaaggcaag	ctgtaaccaa	33180
aagagcaacc	tgggaaacac	atgactcctc	tggtgctgtc	cctggcccta	tcctgtctcc	33240
cctccctggt	gtcagctacc	tcatagttgc	tctaactctc	gtctctgtgc	cctcaaagac	33300
ccccctgaaa	atagaaatat	tactgctcat	tggttatttt	ctatcaatta	agtactgtat	33360
tagtccggtt	tcattgctgat	gataaagata	taccaagac	tgggcacttt	atgaaagaaa	33420
gagttttatt	gaacttacag	ttccacgtgg	ctggggaggt	ctcacaatca	tggtggaagg	33480
tgaaaggcac	atctcacatg	gcagcagaca	ggagaagagg	gcttgttcag	ggaaactccc	33540
ctttttaaaa	ccatcagata	tcataaaact	tatttactgt	aatgagaaca	ggatgggatt	33600
caattacctt	ccactgggtc	gctccacaaa	cacgtgggaa	ttcaagagat	ttgggtgggg	33660
acacagccaa	accatatcaa	gtactgtgca	agtgttttag	gcattgcagag	agtgggtggg	33720
cttccagca	agcagagtgt	ggggaggtaa	tgggggactg	gtggctgact	taatggccca	33780
ggacccatgc	cacaaaggaga	tggtggtgg	atgtgaatag	gagcctgctt	acacccatca	33840
caatttagat	tcttatgctc	gatggcacgg	gtactctttt	aggccatttt	taccaatgag	33900
gagattggga	ctaatttgct	cgagatcaaa	aaagaagtgg	tgtaggtggg	atttaaaacc	33960
aggatgtcta	gcactaaaa	gcaggtactt	aaccactatc	ctaagggagt	ggctacttaa	34020
tttgataaac	tcacttagtg	aatgggaagag	agacggttac	atttctactga	tggtactgag	34080
cctttgttga	tgagctcatt	gggaatctca	gacatgagca	ggatgtgtct	aagggaacag	34140
tggtgttcag	tagactggct	aactcctgca	gtctctttta	ctggacagtt	tcaagaggaa	34200
aaccaagaat	ccttgaagct	caccattgtta	tcttcttttc	caggttgtcc	aataactgca	34260
tcacctaact	aggggcagaa	gccctcctgc	aggcccttga	aaggaaatgac	accatcctgg	34320

```

aagtctggta aggccctgg gcaggcctgt tttagctctc cgaacctcag tttttctatc 34380
tgtaaaatgg ggtgacggga gagaggaatg gcagaatttt gaggatccct tctgattctg 34440
acatttcagtg agaattgattc tgcattgtgaa ggatcttgatt ctctgtctaa gaaagaagtc 34500
tttacctctt taagttagga gcaatgattt cattttttaa ccttgactat ttattcagca 34560
acttctctgc tctatgagat agtgtaggaa tggggatgtg gttgaagaat gaaaagaaaa 34620
gtcagctccc gccctcctag aaattgcatc tgccttcaca ggtcaaggat attggatcag 34680
accttctgcg gttctgaatg gagattacac aggttaggag caggttgcac agtgtttcca 34740
atttctctata attaaagcca tagactttca tgtattgaaa aaagcaagaa ttgcattctt 34800
gacagattctt ttcattgcct taaaaagaat gactagcctt gggagtctgg gcagctgggt 34860
ccagtgttgt agactttctc tctgctgagc cacagcttca aagatttgtc cttcttgttt 34920
ccagggatct atttctcaga caataagtaa aggccttccc tggcctaattg tgctgtaagt 34980
gaatgctact atatatgttc caggcactgg gctagagact aatattttaa agccaggaaa 35040
tttctctatag aaaatctata tctcagggtt ttctcaaaag agctgggaac tctggatgcc 35100
cattcatgat tccagtagtt aaccagagta caagaagggc tgagtcttct cagatgggca 35160
aaccactctt ggctgactgc agatccacca agcctattgt cttagaccag gaccttttgg 35220
caactcattc ccataagcct gtgacccttg ctttaaataat gcaggccttg tcttctctca 35280
aaaagcacat caaggctgca gcgaatgcag atatcaaatg atgaagttaa aaacaaaagc 35340
tttgtctggc gtggcagctc acacctgtaa tcctagcact ttgggaggct gaggcaggag 35400
gatcacttta ggccagaggt tcaacaccag acctgtgtct tcaaaaaata aaaaattcag 35460
ctgggtgctg tgtagttcct agccacttgg gaggtctgga tggaaaggatc ccttgaacct 35520
aggagttaa ggctgcagtg ggccatgatt gcatcactgc acaggcgaca gaattagatc 35580
ccatctctta aaaaaataaa aaatttaaaa gtgacttcaa aaatctatgc tgtgatggag 35640
agatttttcc tctgtatga ttgtgatagc tctgtggcct atgacgtcat caggttctgg 35700
gcaaagtgtg ggttttctgt ttctttgttt ttgaaacct tgcacagtcc taagaaacat 35760
cacattcttg gtctctggca ccagccaaca tgaggtgagg gcaccagggt ttgctcattg 35820
cattcttgac agattctctt attgccttaa aaagaatcac tggccttggg gagtctgtgg 35880
ctggctgggt gcagtgtgtt ggactctctc tgcagagtca tggagccttg ttcagaatgc 35940
ttcttgagct gccctggttg gccaaaggta aaaacagccc tgacttccct gcaagaaaca 36000
ctgcagctgg gccagagagt cagcccatcc caggcatggg tttaaaaagt ggaggctttt 36060
gtttgaaagc cctgtcttaa tttgtctcct actcaaacct ctgttcaact gatctgcttt 36120
aggctccgag ggaacacttt ctctctagag gaggttgaca agctcggtg cagggaacac 36180
agactcttgc tttgaagtct ccgggaggat gttcgtctca gtttgtttgt gagcaggctg 36240
tgagtttggg cccagaggc tgggtgacat gtgttgagc cctcttcaaa atgagccctg 36300
tcctgcctaa ggtgaaactt gttttctggg aacaccatag gtcaccttta ttctggcaga 36360
ggagggagca tcagtgcctt ccaggataga cttttcccaa gcctactttt gccattgact 36420
tcttcccaag attcaatccc aggatgtaca aggacagccc ctctccata gtatgggact 36480
ggcctctgct gatectcca ggcttccgtg tgggtcagtg gggcccatgg atgtgcttgt 36540
taactgagtg ccttttggtg gagaggccc gcctctcaca aaagaccctt taccactgct 36600
ctgatgaaga ggagtacaca gaacacataa ttcaggaagc agcttccccc atgtctcgac 36660
tcattccatcc aggcatttcc ccgtctctgg ttccctcccc cctcctggac tcctgcacac 36720
gtccttccct ctgaggctga aattcagaat attagtgacc tcagctttga tatttcaact 36780
acagcaccce caacctggc acccagggtg ggaagggcta cacttagcc tgccctcctt 36840
tccggtgttt aagacatttt tggaagggga cacgtgacag ccgtttgttc cccaagacat 36900
tctaggtttg caagaaaaat atgaccacac tccagctggg atcacatgtg gacttttatt 36960
tccagtgaat tcagttactc ttcagttaag ccttttgaaa cagctcgact ttaaaaagct 37020
ccaatgcag ctttaaaaaa ttaatctggg ccagaatttc aaacggcctc actaggcttc 37080
tggttgatgc ctgtgaactg aactctgaca acagacttct gaaatagacc cacaagaggc 37140
agttccattt catttgtgcc agaattgctt aggatgtaca gttatggatt gaaagttaac 37200
aggaaaaaaa attaggcgt tccttcaag caaatgtctt cctggattat tcaaaatgat 37260
gtatgttgaa gcctttgtaa attgtcagat gctgtgcaaa tgttattatt ttaaacatta 37320
tgatgtgtga aaactggtta atatttatag gtcactttgt ttactgtct taagtttata 37380
ctcttataga caacatggcc gtgaacttta tgctgtaaat aatcagaggg gaataaactg 37440
ttg 37443

```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 1315

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (117)..(1118)

&lt;400&gt; 4

```

cgatcagaag caggtcacac agcctgtttc ctgttttcaa acggggaact tagaaagtgg 60
cagcccctcg gcttgctgcc ggagctgaga accaagagct cgaaggggcc atatga cac 119
                                                    His
                                                    1

tcc tcc cgg acc cct gga cac aca cag ccc tgg aga ctg gag cct tgg 167
Ser Ser Arg Thr Pro Gly His Thr Gln Pro Trp Arg Leu Glu Pro Trp
                    5                      10                      15

agc atg gca agt cca gag cac cct ggg agc cct ggc tgc atg gga ccc 215
Ser Met Ala Ser Pro Glu His Pro Gly Ser Pro Gly Cys Met Gly Pro
                    20                      25                      30

ata acc cag tgc acg gca agg acc cag cag gaa gca cca gcc act ggc 263
Ile Thr Gln Cys Thr Ala Arg Thr Gln Gln Glu Ala Pro Ala Thr Gly
                    35                      40                      45

ccc gac ctc ccg cac cca gga cct gac ggg cac tta gac aca cac agt 311
Pro Asp Leu Pro His Pro Gly Pro Asp Gly His Leu Asp Thr His Ser
                    50                      55                      60                      65

ggc ctg agc tcc aac tcc agc atg acc acg cgg gag ctt cag cag tac 359
Gly Leu Ser Ser Asn Ser Ser Met Thr Thr Arg Glu Leu Gln Gln Tyr
                    70                      75                      80

tgg cag aac cag aaa tgc cgc tgg aag cac gtc aaa ctg ctc ttt gag 407
Trp Gln Asn Gln Lys Cys Arg Trp Lys His Val Lys Leu Leu Phe Glu
                    85                      90                      95

att gct tca gct cgc atc gag gag aga aaa gtc tct aag ttt gtg gtg 455
Ile Ala Ser Ala Arg Ile Glu Glu Arg Lys Val Ser Lys Phe Val Val
                    100                      105                      110

tac caa atc atc gtc atc cag act ggg agc ttt gac aac aac aag gcc 503
Tyr Gln Ile Ile Val Ile Gln Thr Gly Ser Phe Asp Asn Asn Lys Ala
                    115                      120                      125

gtc ctg gaa cgg cgc tat tcc gac ttc gcg aag ctc cag aaa gcg ctg 551
Val Leu Glu Arg Arg Tyr Ser Asp Phe Ala Lys Leu Gln Lys Ala Leu
                    130                      135                      140                      145

ctg aag acg ttc agg gag gag atc gaa gac gtg gag ttt ccc agg aag 599
Leu Lys Thr Phe Arg Glu Glu Ile Glu Asp Val Glu Phe Pro Arg Lys
                    150                      155                      160

cac ctg act ggg aac ttc gct gag gag atg atc tgt gag cgt cgg cgc 647
His Leu Thr Gly Asn Phe Ala Glu Glu Met Ile Cys Glu Arg Arg Arg
                    165                      170                      175

gcc ctg cag gag tac ctg ggc ctg ctc tac gcc atc cgc tgc gtg cgc 695
Ala Leu Gln Glu Tyr Leu Gly Leu Leu Tyr Ala Ile Arg Cys Val Arg
                    180                      185                      190

cgc tcc cgg gag ttc ctg gac ttc ctc acg cgg ccg gag ctg cgc gag 743
Arg Ser Arg Glu Phe Leu Asp Phe Leu Thr Arg Pro Glu Leu Arg Glu
                    195                      200                      205

```

gct ttc ggc tgc ctg cgg gcc ggc cag tac ccg cgc gcc ctg gag ctg 791  
 Ala Phe Gly Cys Leu Arg Ala Gly Gln Tyr Pro Arg Ala Leu Glu Leu  
 210 215 220 225

ctg ctg cgc gtg ctg ccg ctg cag gag aag ctc acc gcc cac tgc cct 839  
 Leu Leu Arg Val Leu Pro Leu Gln Glu Lys Leu Thr Ala His Cys Pro  
 230 235 240

gcg gcc gcc gtc ccg gcc ctg tgc gcc gtg ctg ctg tgc cac cgc gac 887  
 Ala Ala Ala Val Pro Ala Leu Cys Ala Val Leu Leu Cys His Arg Asp  
 245 250 255

ctc gac cgc ccc gcc gag gcc ttc gcg gcc gga gag agg gcc ctg cag 935  
 Leu Asp Arg Pro Ala Glu Ala Phe Ala Ala Gly Glu Arg Ala Leu Gln  
 260 265 270

cgc ctg cag gcc cgg gag gcc cat cgc tac tat gcg cct ctg ctg gac 983  
 Arg Leu Gln Ala Arg Glu Gly His Arg Tyr Tyr Ala Pro Leu Leu Asp  
 275 280 285

gcc atg gtc cgc ctg gcc tac gcg ctg gcc aag gac ttc gtg act ctg 1031  
 Ala Met Val Arg Leu Ala Tyr Ala Leu Gly Lys Asp Phe Val Thr Leu  
 290 295 300 305

cag gag agg ctg gag gag agc cag ctc cgg agg ccc acg ccc cga gcc 1079  
 Gln Glu Arg Leu Glu Glu Ser Gln Leu Arg Arg Pro Thr Pro Arg Gly  
 310 315 320

atc acc ctg aag gag ctc act gtg cga gaa tac ctg cac tgagccggcc 1128  
 Ile Thr Leu Lys Glu Leu Thr Val Arg Glu Tyr Leu His  
 325 330

tgggaccccg cagggacgct ggagatttgg ggtcaccatg gctcacagtg ggctgttttg 1188

ggttcttttt ttttattttt ccttttcttt tttgttattt gagacagtct tgctctgtca 1248

cccagactga agtgcagtgg ctcaattatg totcactgca gcctcaaact cctgggcaca 1308

agcaatc 1315

<210> 5  
 <211> 334  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 5  
 His Ser Ser Arg Thr Pro Gly His Thr Gln Pro Trp Arg Leu Glu Pro  
 1 5 10 15

Trp Ser Met Ala Ser Pro Glu His Pro Gly Ser Pro Gly Cys Met Gly  
 20 25 30

Pro Ile Thr Gln Cys Thr Ala Arg Thr Gln Gln Glu Ala Pro Ala Thr  
 35 40 45

Gly Pro Asp Leu Pro His Pro Gly Pro Asp Gly His Leu Asp Thr His  
 50 55 60

Ser Gly Leu Ser Ser Asn Ser Ser Met Thr Thr Arg Glu Leu Gln Gln

65		70		75		80
Tyr Trp Gln Asn Gln Lys Cys Arg Trp Lys His Val Lys Leu Leu Phe						
	85			90		95
Glu Ile Ala Ser Ala Arg Ile Glu Glu Arg Lys Val Ser Lys Phe Val						
	100		105		110	
Val Tyr Gln Ile Ile Val Ile Gln Thr Gly Ser Phe Asp Asn Asn Lys						
	115		120		125	
Ala Val Leu Glu Arg Arg Tyr Ser Asp Phe Ala Lys Leu Gln Lys Ala						
	130		135		140	
Leu Leu Lys Thr Phe Arg Glu Glu Ile Glu Asp Val Glu Phe Pro Arg						
145		150		155		160
Lys His Leu Thr Gly Asn Phe Ala Glu Glu Met Ile Cys Glu Arg Arg						
	165		170			175
Arg Ala Leu Gln Glu Tyr Leu Gly Leu Leu Tyr Ala Ile Arg Cys Val						
	180		185			190
Arg Arg Ser Arg Glu Phe Leu Asp Phe Leu Thr Arg Pro Glu Leu Arg						
	195		200		205	
Glu Ala Phe Gly Cys Leu Arg Ala Gly Gln Tyr Pro Arg Ala Leu Glu						
	210		215		220	
Leu Leu Leu Arg Val Leu Pro Leu Gln Glu Lys Leu Thr Ala His Cys						
225		230		235		240
Pro Ala Ala Ala Val Pro Ala Leu Cys Ala Val Leu Leu Cys His Arg						
	245		250			255
Asp Leu Asp Arg Pro Ala Glu Ala Phe Ala Ala Gly Glu Arg Ala Leu						
	260		265			270
Gln Arg Leu Gln Ala Arg Glu Gly His Arg Tyr Tyr Ala Pro Leu Leu						
	275		280			285
Asp Ala Met Val Arg Leu Ala Tyr Ala Leu Gly Lys Asp Phe Val Thr						
290		295		300		
Leu Gln Glu Arg Leu Glu Glu Ser Gln Leu Arg Arg Pro Thr Pro Arg						
305		310		315		320
Gly Ile Thr Leu Lys Glu Leu Thr Val Arg Glu Tyr Leu His						
	325		330			

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 8135

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; exon

&lt;222&gt; (1)..(161)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (3812)..(3950)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (5426)..(5577)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (7273)..(8135)

<400> 6  
 cgatcagaag caggtcacac agcctgtttc ctgttttcaa acgggggaact tagaaagtgg 60  
 cagccccctcg gcttgtcgcg ggagctgaga accaagagct cgaagggggc atatgacact 120  
 cctcccgagc ccctggacac acacagccct ggagactgga ggtcagtatt tgatcccaag 180  
 ctgagctgtc ctctgcctgc tgtggcctga gtccccctct cctggggccc tgccctggcag 240  
 ctgctggggg caggggtgga gggggaagag ttagtgacag ccgctgtgtc tggagctctc 300  
 cttagcacac tgaggcagag gaagggacag ctccctggacc ttccatcacc tccattccctt 360  
 ttgaaatgct aggcgcttgt acaacccatc ttgggccttg agaataagtc accacacctg 420  
 tgttttctcaa aagaacagtg tcagggaacc cctgcctcag cacagcctta gaggactcat 480  
 ggaaaaatgca gaatccaggc ctgttcaatg gcaccttcct atgttagcag ccaggaaacc 540  
 tgctcttgga caagccctcg ggatcccacc cccacccacc caggggattc ttacacacac 600  
 tgggttgga gcccctggct ttggcaaggc ttctcaggtg agcgtccagt tgttgaggag 660  
 taccacccct ttccccaaga gaggcagcca cacatccaac atcctgggat ctctgtctcc 720  
 cagcgtgggc catgtgcttt atttcacccc ctagaggctc atcccccatg aaaagtcctc 780  
 cgcaggccct cagaaagata gtgtggcctc tgtgtgcca gcagaagaag gactggactt 840  
 ggagctcagc tcttgagag ggggtgggta ggacacctgg ggacaggagg aggagaatga 900  
 ctgtctgtgc acacacggct ggaaggtaca ggaggctggg aagctgctct gtcccctggg 960  
 ccaactacag gccccaggc caacagcaac aacactttta gtattttgtt ataaagtcaa 1020  
 gaaatctttg ctacagaggg tgaggagagg gaaggaaagg gccatggaac cgtctatgtg 1080  
 gctatcccca gagagctttt agagtgcag gattgctttc ccatttcaca gatgaggaaa 1140  
 ctgaggcctg gagaggatg ggaagctacc caaggcccca tggatacacc agtgacacaac 1200  
 tctttccttc cccctcctct ttaaatgggt gattcccaat gaaacctgta agagacaacc 1260  
 ataaggagac tgactgtggc tgcgaattt gattttattc taaggcctgg ttttataatc 1320  
 agctttctca gcttttactg gagtgtcaag ccgaggcatc atttctaggg tcttacaggg 1380  
 tctctgggac aatagtccc tgcctctgac ctggagccag ctgcctgtc atgaaagcag 1440  
 atctgcaaag gctggggccc ctgaggccaa ggccactcgc catcaccatc tttacagaag 1500  
 tgctgagcat aggagtccc tgggccccca agaatcccag ccaccaagaa tcacgtaaac 1560  
 catccactgt ctcaattagg caccagtcag aatgtaggga acccaccct agtcatccat 1620  
 catcttatca acaggacggg gcttgtagcc acatttatca ggtagggaaa ctgaagccta 1680  
 gagatattaa agcacttgct taaggacaca cggttggtca ggatggaagg cgatgtctcc 1740  
 tgactccctg acaggcaca gagacaagg agagtgccc gtgacggcat gctcaagaac 1800  
 gtgcagccct gggccagcca gggccctgct ccgtgcctct gtttgccat ctgtaaaagg 1860  
 tgagggtgga tcgagggtcc ctgagggccg cccactggat ggctgtgcag agccaaacgg 1920  
 agaaggcccc agggttcctt tcaccogaca cagcaagcac ttcccctga agtgcaggct 1980  
 ccaggcccca gctgacctcc cctctcccag gccagcggtc ctacccctg gagcaaggga 2040  
 caggcgctgg ctgtgctcag ggacatgcat gactccgccc cccatctgtg ctgagggggt 2100  
 gccaggagg cactggctct atctttctct aggcctagt cagcccagg gttcagacca 2160  
 agagccpaga atccaacaga tcagagttca agtcccagct ctacctctat gttccactgg 2220  
 cagcttcctc aggtcatttg caccttcctt gtcttgaatt tccatgccta accagtatac 2280  
 cagctactcc ctccagccga tctaattgtt taattgtccc tttctctaag ttgtctcaa 2340  
 catttgtaat tctattccaa tccaccttaa tttagtcatt tatttcaca atatttctgg 2400  
 aaacatctag cacttaacag aactaaag cggggttact acacagtcct tgggatggac 2460  
 agggccctga gctgaggctt cagagtctgc ctgactgaat cctcaccoca gccttgtaga 2520  
 cgtgggttct gttattatcc ccaatttata ggaaacagaa gcacagagaa gttgagtcac 2580  
 ttgccagcta ccaggctatc ccttccactt atccgggtca cagacagagt tattatgtaa 2640  
 accagatccc agctgcctgt tctccctccc tgagtaagggt ggagagaatt ctgaagtcag 2700  
 ccagccctgg gctgttatcc tgcccaccac tcaccagctc ctcatcttgg gcaactctaa 2760  
 gtctcagttc ccttatcata aaaggagat gtaaacagtc ctgagtgcag acagtgttca 2820  
 ggttagtgca agagtgtgtg ctgggtgtga agtgacagc cagcacgtca caagcactgg 2880

```

agacaaattc agctttgctt gttgcgcaca ctcaccagct gcgtgacttt agacctcagt 2940
tttctcatct gttatgtggt ggtaatgata gacttttctg agcattaaac tagattaggg 3000
gctatggaga acctagatgg gtatgaagtg ggtataataa gctatcagtt aattttgctg 3060
atagatagat tattgattga ttgatcgata gaagattcat accagtatct acctgctctg 3120
aacactgacc tttctttttt tctttttgag atggctctgt tctgtcacc agactggagt 3180
gcagtgggcat catcatagct cactgcagcc tcagctctct gggcttaagg gatcctcctg 3240
tctcagcctc ccaagtagct gggaccacag gcgtgcaccc tggataaatt ttttttattt 3300
tttctagaga cggggtctca ctacattggc caggctggtc tcaaattcct gggctcaagt 3360
gatccttcta acccagcctc ccaaagcgct gggattacag gcatgagtg ccatgttcaa 3420
cttgaacact gagacttcat tcgcatgtgt aacataaaac tgagtatcta gacaagccag 3480
catctttctt tcaagtaatc actaaagcca atacttttac ttgaaatcat ctcatttaaa 3540
actctgagca atacgtaagg atcacctcaa taacatatgg atcatcgcaa taggtgaagg 3600
gtcttctctg ccttgagta acctgccag caaaggggca gaccagatt tgggatctgg 3660
cagctgggag agtggggaag gttgagccgt ggggcccttg tcattccctc tgcctgccag 3720
gagggggcat gacacagctc ctaggcacc caggagccac cggaacccc aactggagtg 3780
ggctcctcact gttctctttt tctcttgga gccttgagc atggcaagtc cagagcacc 3840
tgggagccct ggctgcatgg gaccataaac ccagtgcag gcaaggaccc agcaggagc 3900
accagccact ggccccgacc tcccgcaccc aggacctgac gggcacttag gtgggcttga 3960
ggcttgagac tcggtctggg ggagaggtct gaagacattc aaagtacaaa tgtgggtcac 4020
tttgggggat gcagcaagag gcccgggcag ctcttgtaac ttgggttatc ccaaaacaga 4080
cactgagaca cagatctagt gcaagctgtt tatccgggag acggtcctag gagtcatggc 4140
aggggagtg gaatggaagg aaagggcaag aggccagggc aggacatcag tgaacagata 4200
ggcacggtag gtggctgaag ctcaacccca gcgggggtct tctgggagac cctggaacat 4260
atctctgggt tgcctatcc taggggtgag gaagccgggc tgttatctac cagtctgcc 4320
ctgcatagga gaagggacgc tctgggcct gctgctatgg ccctagaaag ccctcaggga 4380
agccagtggc atgttctgga aaagtgggtg ccaagagggc acggtccagc ctggggcatg 4440
gacagcatct gctgtagtgc catctcctgg aacagatctt ttcttacagt ccttcgagat 4500
gccctattca atacctgctc tgttcctggc cctatgcagg gcaactgaga aacagaaaca 4560
ggaagaaatc aaacactgca ctagtctga ggtttgtag agaaacagat cagtgagaaa 4620
cagttacacg tgccacgaga aataaataaa taaatgaaa aacctgtagg aacaaggtg 4680
gaagctctta ctctaagcc aaggggcatt tgcagtgtg tgggggctgg gtcttgaagg 4740
gtagactgga aaagggtg gacccatgcc ctttgcaata aaatgcacaa ttatttgtgc 4800
ttcttaagaa cctcagagt ggcagggct caagtgggt ttaagaaaca ctgtgttctg 4860
tttccaggcg tggaaataga ggggttgatg caaggcagag cagtgcacgt ccgagaagag 4920
ccggcatgt gggcagttag atgagaaggt taggaagggc cagcccgctg aggtggaac 4980
ataacatcct cctcactgcc tcccctgcc actgatgtgt gctcaaggag tctgggcaac 5040
agtcacgaag tcagggtctg agggagcaca gaaacacaca agccaccgtc tctgctgtgc 5100
cagagcaggg atttcaccat ggccaatcta cagaccagaa gtggacgatg caaagtgcc 5160
gcaccgcat ccaaagctgt gaaaccactt gggggtgatg ggctatttgg gattgtcgg 5220
ggtagggtgg attctgccag gctgggcaca gaggctctgt tgatgcccc attgggcta 5280
taaattggcg ggtgggagag agggatattc aatactctt aggagtctg atatgccatc 5340
tcagatagac ccagccatct ccccaagccc atgcctcgga agtgactga cagggtgcag 5400
atccttaagg gtgttgcct tccagacaca cacagtggcc tgagctccaa ctccagcatg 5460
accacgchg agcttcagca gtactggcag aaccagaaat gccgctggaa gcacgtcaa 5520
ctgctctttg agatcgcttc agctcgcatc gaggagagaa aagtctctaa gtttgtgta 5580
agcagagatt gggaaatggg ggagcctct tcaactgtct tcttctctg ccctgaataa 5640
gtctttaga gccctagggt tcccaactat gaaatgggtc aacacactaa ctccagctt 5700
tcttctggag aaaatggcca aagagcaaga ttccaggctc agcacctgct agggctctgt 5760
aggattcgaa ccatataagt catatttctt ggtcccaaga aggaaatagc ccagttaat 5820
cccatcttat cagggtgcag tcacctgtgt cctttcttca ccaattttgc catatcactg 5880
tatctgttct aattattatt acttattttt ttctttaaat tggatcactt tttaaaaaca 5940
tgaagcacat ttatttcaa gagaaatacc ttaaattgga aaccaatatc acatggcaca 6000
aagcaaaagt aacatactag aaaagtctg atcaaggaaag tcaatacaag gaaagctatg 6060
tgctgttatt aaattctagc tggttactgt ggcttcggga aagccctgtg cctgggagct 6120
gctcctctc ctgttagaat ggaattttag ctgtgttaa gggatgttaa agactgccta 6180
agagccacac ttcatccttc tccctcactt acctgggacc gggataaata acatagctac 6240
cactgaatgc caatggcatg ccgggcacag ctccatgttg tttcagtga ttaactcatt 6300
taatcctcac tgggtgaggt aggcactatg cctatccttg ttttatgaat gagaaaagt 6360
agactcgag aggttaaatt actcatctaa aaccacacag cttagacctg gtagggctat 6420
aattacaacc catgcaatct ggctctggag tcagatgcat gggttataat tgcccttaat 6480
atataattgc ccgtaatcag gattctcttg aaagatgatt gaaaaggatt gattttctta 6540

```



```

ccatataacg gcatcaccag tgtacctaaa tgatgttata ttgtacgtaa aactaattcc 6600
caagtgtgaa acatttggaa aacacagcat ctcaagttcag aaaacagagg cccagtttta 6660
gcaagtaaaag ccaagaggga ccccagcagc ctgcaggcca ggaccctctg ccctttctcc 6720
tcccagatgt ccccaccttg ctgtgttggt gtccagggt tgactcagct gatgccaata 6780
gcaattttaa acagaattgg gccagggtgca gtggctcatg cctgtaatcc cagcactttg 6840
ggaggcccag gtaggaggat cgcttgagcc caggagttgg agaccagcct gggcaacaca 6900
gccagacccc atctttttaa aagaatcaaa aaatctgcca ggtagtgggt gtgcctgtag 6960
tcccagctac tcaggaggct cagggtgggca ggtcaattga gcccataagt tcaaggttgc 7020
agtggaggtat gatcgcatca ctgtactcca gcctgggtaa cagtgcgaga ccctgtctct 7080
aaaaataaat aaataataaa ataaataaat aaataaacia acaacaaac aaacaaacia 7140
tcaattgcat ataaggatcg cccgttttca gggcatgctt tacaccggcc tggttaactt 7200
tactctgggt gtgctccgct cgccgcagcc cccgccgga ggtggccaca gctctctctg 7260
gttgccgccct aggtgtacca aatcatcgct atccagactg ggagctttga caacaacaag 7320
gccgtcctgg aacggcgcta ttccgacttc gcgaagctcc agaaagcgct gctgaagacg 7380
ttcaggagg agatcgaaga cgtggagttt cccaggaagc acctgactgg gaacttcgct 7440
gaggagatga tctgtgagcg tcggcgcgcc ctgcaggagt acctgggct gctctacgcc 7500
atccgctgcg tgcgcgctc ccgggagttc ctggacttcc tcacgcggcc ggagctgcgc 7560
gaggctttcg gctgcctgcg ggccggccag taccgcgcg cctggagct gctgctgcgc 7620
gtgctgccgc tgcaggagaa gctcacgcc cactgccctg cgccgcgct cccggccctg 7680
tgcgcgctgc tgctgtgcca ccgcgacctc gaccgccccg ccgaggcctt cgccggccgga 7740
gagaggggcc tgcagcgct gcaggcccg gagggccatc gctactatgc gcctctgctg 7800
gacgccatgg tccgcctggc ctacgcgctg ggcaaggact tcgtgactct gcaggagagg 7860
ctggaggaga gccagctccg gagggccacg ccccaggga tcacctgaa ggagctcact 7920
gtgcgagaat acctgcactg agccggcctg ggacccgca gggacgctgg agatttgggg 7980
tcaccatggc tcacagtggg ctgtttgggg ttcttttttt ttatttttcc ttttcttttt 8040
tgttatttga gacagtcttg ctctgtcacc cagactgaag tgcagtggct caattatgtc 8100
tcactgcagc ctcaactcc tgggcacaag caatc 8135

```

<210> 7  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 7  
 ctgggtgcga ttgctc 16

<210> 8  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 8  
 ccaggcccca tgacag 16

<210> 9  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 9  
 tgggtcccgc ccaatcccaa tgctt 25

<210> 10  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 10  
ttcctcatgt ataaattggg tgtggcca

28

<210> 11  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 11  
acagagtgag gaccccatct ctatc

25

<210> 12  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 12  
tccaactgct gggattacag gcaca

25

<210> 13  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 13  
agtccccgag accagggcaa ac

22

<210> 14  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 14  
tccatttctg cagtacacat gca

23

<210> 15  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 15  
ctctcccat agaaggcatc

20

<210> 16  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 16  
ggatagagac gttctcttaa

20

<210> 17  
<211> 20  
<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 17

caggctgaat gacagaacaa

20

<210> 18

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 18

attgaaaaca actccgtcca

20

<210> 19

<211> 25

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 19

atactcactt ttagacagtt caggg

25

<210> 20

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 20

ggctcagttc ctaaccagtt c

21

<210> 21

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 21

agtcagtctg tccagaggtg

20

<210> 22

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 22

tgaatcttac atcccatccc

20

<210> 23

<211> 17

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 23

gatcttccca aagcgcc

17

<210> 24

<211> 17  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 24  
tcccgtcagc caagcta

17

<210> 25  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 25  
aagcttgat ctttctcagg

20

<210> 26  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 26  
atctaccttg gctgtcattg

20

<210> 27  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 27  
cctccataat catgtgagcc

20

<210> 28  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 28  
aatctcccca actcaagacc

20

<210> 29  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 29  
ggatgcctgc tctaaatacc

20

<210> 30  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 30  
cccaggggtc aaacttaat

19

<210> 31  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 31  
ggtttgaaag tatctccagg g

21

<210> 32  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 32  
ggtttgaaag tatctccagg g

21

<210> 33  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 33  
gtgcatgtgt tcgtatcaac

20

<210> 34  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 34  
tcattctccaa aggagtttct

20

<210> 35  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 35  
aaagccaacc ttgcttca

18

<210> 36  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 36  
tcttggaac aggtaagtgc

20

<210> 37  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 37

attgccctca agaacagc

18

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 38

gtgctatgcc atcccag

17

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens,

&lt;400&gt; 39

ccacaccagc gtttttctaa

20

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 40

cacactttac acacacctat accc

24

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 41

aagccatatt aggtctgtcc at

22

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 42

gcttgggtta aatgcgtgt

19

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 43

agcagtttgg gtaaaccattg

20

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 44  
aaatatgcct tctggagggtg 20

<210> 45  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 45  
ggaggatcag gggagtttat 20

<210> 46  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 46  
caaagtaaataaat gaatgtctac tgcc 24

<210> 47  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 47  
ccaactctgt agtttcaaag agc 23

<210> 48  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 48  
tcacagccta cttgcttggt 20

<210> 49  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 49  
gacagcctca aatgaaatat aacac 25

<210> 50  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 50  
gctctcagct agggtagttg tttat 25

<210> 51  
<211> 25

<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 51  
attttttaagg aatgtaaagn acaca

25

<210> 52  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 52  
gaccaggagt cagtaaaagg

20

<210> 53  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 53  
gtccaaaaca ccaccctcta

20

<210> 54  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 54  
gaagtagatc agtcattcttg ctgc

24

<210> 55  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 55  
tcctctgggg gattcactc

19

<210> 56  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 56  
gggacatcac caagcacaag

20

<210> 57  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 57  
caggaaaata aatctaacac acata

25



<210> 58  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 58  
cctgtgggca ctgataaata  
  
<210> 59  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 59  
cccagcccc atctcacg  
  
<210> 60  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 60  
cccagcccc atctcacca  
  
<210> 61  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 61  
ctgcggagga ggctgctgg  
  
<210> 62  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 62  
tcactccac cacccttc  
  
<210> 63  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 63  
agaagtttag tgtggcgtgg  
  
<210> 64  
<211> 17  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 64  
gccatctccc caagccc

20

19

19

19

19

20

17

<210> 65  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 65  
tcgatgcgag ctgaagcg

18

<210> 66  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 66  
tcgatgcgag ctgaagca

18

<210> 67  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 67  
tgaatgttaa agggctctgg

20

<210> 68  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 68  
ttggttctca gctccggcg

19

<210> 69  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 69  
ttggttctca gctccggca

19

<210> 70  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 70  
agaaaccggg ctggctgtg

19

<210> 71  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

WO 01/72822

PCT/FR01/00935

<400> 71  
gcattgcctt ttgatctcta c

21

<210> 72  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 72  
tgggctcttc tgcgggga

18

<210> 73  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 73  
tgggctcttc tgcggggg

18

<210> 74  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 74  
tgcctcttct tctgccttcc

20

<210> 75  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 75  
cgagctgtac ctgaggaagc gt

22

<210> 76  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 76  
cctgagctgt acctgaggaa gcgc

24

<210> 77  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 77  
catcatgagc ccgggggtggc

20

<210> 78  
<211> 23  
<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 78

tttctcttgg cttcctggtg cgt

23

<210> 79

<211> 25

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 79

accttctctt ggcttcctgg tgcgg

25

<210> 80

<211> 26

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 80

gccaaaggtg tcgtgccagg gctcca

26

<210> 81

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 81

atctgagaag gccctgctct

20

<210> 82

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 82

atctgagaag gccctgctcc

20

<210> 83

<211> 19

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 83

cccacactta gccttgatg

19

<210> 84

<211> 19

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 84

atgagtttagc ccagcggag

19

<210> 85

WO 01/72822		PCT/FR01/00935
<211> 19		
<212> ADN		
<213> Homo sapiens		
<400> 85		
attgagagcc cttggagtg		19
<210> 86		
<211> 19		
<212> ADN		
<213> Homo sapiens		
<400> 86		
tgatttcgta agacaagtg		19
<210> 87		
<211> 20		
<212> ADN		
<213> Homo sapiens		
<400> 87		
agcaaattct aggagttatg		20
<210> 88		
<211> 19		
<212> ADN		
<213> Homo sapiens		
<400> 88		
agctgagatg tccg gatcg		19
<210> 89		
<211> 18		
<212> ADN		
<213> Homo sapiens		
<400> 89		
agctgagatt ccg gatca		18
<210> 90		
<211> 20		
<212> ADN		
<213> Homo sapiens		
<400> 90		
gtcctcttaa cttcccttcc		20